

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

特表平6-500239

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)1月13日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/53			
A 0 1 H 5/00	A	8502-2B	
C 1 2 N 9/02		9359-4B	
15/82			

審査請求 有 予備審査請求 未請求(全 29 頁)

(21) 出願番号	特願平5-501846	(71) 出願人	インターナショナル フラワー ディベロ ブメンツ プロプライエタリー リミティ ド
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)7月8日		オーストラリア国, ビクトリア 3066, コ リングウッド, ギブズ ストリート 16
(85) 翻訳文提出日	平成5年(1993)3月10日	(72) 発明者	ホルトン, ティモシー アルバート
(86) 国際出願番号	P C T / A U 9 2 / 0 0 3 3 4		オーストラリア国, ビクトリア 3070, ノ ースコート, オールディス アベニュー19, ユニット 1
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 0 1 2 9 0	(74) 代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(87) 国際公開日	平成5年(1993)1月21日		
(31) 優先権主張番号	P K 7 1 7 3		
(32) 優先日	1991年7月11日		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (A U)		
(31) 優先権主張番号	P L 0 9 2 3		
(32) 優先日	1992年2月17日		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (A U)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、ジヒドロカンフェロール (DHK) ヒドロキシ
ル化酵素又はその誘導体もしくは部分をコードするか、
又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列
を含んで成る核酸単離体に関する。本発明はまた、前記
核酸材料を有し、かつ発現するトランスジェニック植物
に関する。

請 求 の 範 囲

1. ジヒドロカンフェロール (dihydrokaempferol:DHK)ヒドロキシル化酵素又はその誘導体もしくは部分をコードするか、又はこれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸単離体。
2. 前記核酸がDNA又はcDNAである、請求項1に記載の核酸単離体。
3. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項1又は2に記載の核酸単離体。
4. 前記酵素がベチュニア、パーペナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来である請求項1〜3のいずれか1項に記載の核酸単離体。
5. 前記酵素がベチュニア由来である、請求項4に記載の核酸単離体。
6. 図9又は10に記載されているか又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するヌクレオチド配列の実質的にすべて又は部分を含んで成る核酸配列を有する、請求項4又は5に記載の核酸単離体。
7. トランスジェニック植物中存在する場合の請求項1〜6のいずれか1項に記載の核酸単離体。
8. 前記トランスジェニック植物がバラ、ベチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ、ゼラニウム又はユリズイセンである、請求項7に記載の核酸単離体。
9. トランスジェニック植物がバラ又はベチュニアである請求項8記載の核酸単離体。
10. 核酸単離体を植物細胞又は組織に移行させることができるべ

を指令するトランスジェニック植物の製造方法であって、請求項1又は6に記載の核酸単離体を該核酸単離体の最終的発現を可能にする条件下に適当な植物の細胞に導入し、該細胞からトランスジェニック植物を再生し、そして該トランスジェニック植物を前記核酸単離体の発現を可能にするのに十分な時間及び条件下で成長せしめる、ことを含んで成る方法。

22. 前記組換え酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項21に記載の方法。
23. 前記核酸単離体の発現が発生段階により制限される、請求項21又は22に記載の方法。
24. 前記組換え酵素がベチュニア、パーペナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来のものである、請求項23に記載の方法。
25. 前記組換え酵素がベチュニア由来のものである、請求項26に記載の方法。
26. 前記核酸単離体又は酵素が図9又は図10に記載されているのと実質的に同じか又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を有する、請求項23又は24に記載の方法。
27. 前記トランスジェニック植物がバラ、ベチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ又はタバコである、請求項21〜26のいずれか1項に記載の方法。
28. 前記トランスジェニック植物がバラ又はベチュニアである、請求項27に記載の方法。
29. ジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素をコードするか、又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る安定に導入された核酸分子を有するトランスジェニック

クター分子中に含まれる、請求項1〜9のいずれか1項に記載の核酸単離体。

11. 前記移行がアグロバクテリウム (Agrobacterium)との共存培養を必要とする、請求項10に記載の核酸単離体。
12. 前記ベクター及び核酸単離体が図11に示すpCGP90である、請求項10又は11に記載の核酸単離体。
13. 組換えジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素又はその誘導体もしくは部分。
14. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項13に記載の組換え酵素。
15. 前記酵素がベチュニア、パーペナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー及びナス由来である、請求項13又は14に記載の組換え酵素。
16. 前記酵素がベチュニア由来である、請求項15に記載の組換え酵素。
17. 図9又は10に記載の又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列の実質的にすべて又は部分を含んで成るアミノ酸配列を有する、請求項15又は16に記載の組換え酵素。
18. トランスジェニック植物中に存在する場合の請求項13〜17のいずれか1項に記載の組換え酵素。
19. 前記トランスジェニック植物がバラ、ベチュニア、キク、カーネーション又はガーベラである、請求項18に記載の組換え酵素。
20. 前記トランスジェニック植物がバラ又はベチュニアである、請求項19に記載の組換え酵素。
21. 組換えジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素を発現することができるか、又はDHKヒドロキシル化酵素に翻訳できるmRNA分子の全部もしくは部分に実質的に相補的な核酸配列の転写

植物。

30. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項29に記載のトランスジェニック植物。
31. 前記酵素がベチュニア、パーペナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来である、請求項30に記載のトランスジェニック植物。
32. 前記酵素がベチュニア由来のものである、請求項31に記載のトランスジェニック植物。
33. 前記酵素が図9又は2に記載のものと実質的に同じかあるいはそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列を有する、請求項31又は32に記載のトランスジェニック植物。
34. 前記植物がバラ、ベチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ、アイリス、チューリップ、ユリ、リシアンサス (Lisianthus)、フリージア、ヒエンソウ、リムニウム (Limnium)又はベラルゴニウムである、請求項29〜32のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物。
35. 前記トランスジェニック植物がバラ又はベチュニアである、請求項34に記載のトランスジェニック植物。
36. 植物からのシトクロムP450分子又は類似分子をコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子をクローニングする方法であって、1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて1又は複数のポリメラーゼ連鎖反応により前記植物の細胞からの核酸分子の適切な調整物からシトクロムP450ヌクレオチド配列又は相補的な配列を増幅することを含んで成り、前記プライマーが既知のミクロソーム由来シトクロムP450分子の1又は複数のコンセンサス配列に由来するヌクレオチド配列を有するものである、前記方法。

37. 前記コンセンサス配列がシトクロムP450分子のヘム結合ドメインからのものである、請求項36に記載の方法。

38. 前記コンセンサス配列がF(G,S)XGXRXCXGであり、ここでXは任意のアミノ酸である、請求項37に記載の方法。

39. 前記コンセンサス配列がFMPFGAGXRXCGLGであり、ここでXが任意のアミノ酸である、請求項37に記載の方法。

40. 前記シトクロムP450分子又は類似分子がDHK ヒドロキシル化酵素である、請求項36～39のいずれか1項に記載の方法。

41. 前記DHK ヒドロキシル化酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項40に記載の方法。

42. 前記クローン化された酵素が図9又は10に示すのと実質的に同じかあるいはそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列、又はヌクレオチド配列によりコードされているアミノ酸配列を有する、請求項40又は41に記載の方法。

グリコシル化誘導体であるアントシアニンである。異なるアントシアニンが色の顕著な変化を生成することができる。花の色はまた無色のフラボノイドの補助発色 (co-pigmentation)、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液胞のpHにより影響される (Forkmann 1991)。

フラボノイド色素のための生合成経路 (以後、「フラボノイド経路」と称する) はよく確立されており、そして図1に示される (Ebel及びHahlbrock, 1988; Hahlbrock and Grisebach, 1979; Wiering and de Ulaming, 1984; Schramら, 1984; Stafford, 1990)。この経路の第一の必須の段階は3分子のマロニル-CoAと1分子のp-クマロイル-CoAとの縮合を含む。この反応はカルコン合成酵素 (chalcone synthase: CHS) により触媒される。この反応の生成物である2', 4', 6'-テトラヒドロキシカルコンは通常、カルコン・フラバノン・イソメラーゼ (CHI) 酵素により急速に異性化され、ナリンゲニンを生成する。次に、ナリンゲニンはフラバノン3-ヒドロキシラーゼ (PSH) により中央環の3位においてヒドロキシル化されジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol: DHK) を生成する。

ジヒドロケンフェロールのB環は3'位、又は3'位及び5'位の両方においてヒドロキシル化されて、それぞれジヒドロケルセチン (dihydroquercetin: DHQ) 及びジヒドロミセチン (dihydromyricetin: DHM) を生成することができる。この経路に関与する2つの必須の酵素はフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (以後、3'-ヒドロキシラーゼと称する) 及びフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ (以後、3', 5'-ヒドロキシラーゼと称する) である。3', 5'-ヒドロキシラーゼはヒドロキシル化を触媒する広範囲酵素であって、ナリンゲニン及びDHKの3'及び5'位並びにエリオジクテオール及びDHQの5'位 (Stoltz 及び

フラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列及びその使用

本発明は一般にフラボノイド経路代謝酵素をコードする遺伝子配列並びに植物及び他の生物体における色素形成の操作におけるごときその使用に関する。

花類産業は開花植物の新規且つ種々の品種を開発することに努力している。この様な新規な品種を創成するための有効な方法は花の色の操作を通してであり、そして古典的な育種技法を用いて、花類のほとんどの商業的品種について広範囲な色を生成することに幾分成功している。しかしながら、この方法は、特定の種の遺伝子プールの束縛により制限され、そしてこの理由のため単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することはまれである。確かに、青色花の入手可能性が制限されているために、1988年にオランダにおけるオークションで売られた青色の切花は5%未満であった。12種類の最もよく売られている花の内、アイリスとフリージアのみが青色の品種を提供しており、そしてこれらの品種が占める割合は全販売花の4%未満である。主要な切花用種、例えばバラ、菊、カーネーション及びガーベラの青色品種の開発は、切花市場及び観賞市場の両者においてかなりの機会を提供するであろう。

花の色は主として2つのタイプの色素、すなわちフラボノイド及びカロチノイドに基づく。フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与する。カロチノイドはオレンジ又は黄の色調に寄与し、そして一般に黄色又はオレンジ色の花の唯一の色素である。花の色に主たる寄与をするフラボノイド分子は、シアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びペラルゴニジンの

Forkmann, 1982)のヒドロキシル化を触媒し、それぞれペンタヒドロキシフラバノン及びDHMを生成する。B環のヒドロキシル化のパターンが花弁の色の決定において必須の役割を演ずる。

ミクロソーム抽出物中のフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼはNADPH及びO₂並びにナリンゲニン又はDHKのいずれかを必要とする。バセリの細胞培養物の細胞培養物の酵素がよく研究されている (Hagmannら, 1983)。一酸化炭素、シトクロムc及びNADP⁺による阻害が示すところによれば、この酵素はシトクロムP450関連酵素である。類似の酵素、活性がトウモロコシにおいて証明されている (Larson及びBussard, 1986)。3', 5'-ヒドロキシラーゼもまたシトクロムP450クラスの酵素である。シトクロムP450酵素は自然界に広く分布しており、そして脊椎動物、酵母、菌類、細菌及び1種の植物において特性決定されている。少なくとも154のシトクロムP450遺伝子の配列が決定されており、そしてこれらの遺伝子は27の異なる遺伝子ファミリーに類別されている (Nebertら, 1991)。1つのファミリー内においてP450蛋白質配列は一般に40%以上の同一性を有するが、同一のサブファミリー内では46%以上の同一性が存在する (Nebertら, 1991)。

植物において3'もしくは3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性又はフラボノイド経路に含まれる他の酵素を制御する可能性は、花弁の花を操作しそれによって単一の種が広範囲の花色を発現することを可能にする手段を提供するであろう。本発明に従って、3', 5'-ヒドロキシラーゼのごときフラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列が同定されそしてクローン化された。これらの組換え配列はDHK代謝並びにDHQ、ナリンゲニン及びエリオディクテオール (eriodictyol)のごとき他の基質の代謝の調節を可能にし、それによりアントシアニンのヒドロキシル化パターンを決定しそして花弁の

色を操作する手段を提供することを可能にする。しかしながら本発明は、花類のみならず、果実及び野菜植物並びに例えば觀賞用植物の葉に拡張される。

従って、本発明の1つの観点は、ジヒドロカンフェロール (dihydrokaempferol: DHK) ヒドロキシ化酵素をコードするヌクレオチドの配列又はそれをコードする配列に相補的な配列を含んで成る核酸単離体、あるいはその誘導体又は部分を提供する。

単に便宜上及び手短かな表記により、「DHK ヒドロキシ化酵素」への言及は、DHK, DHQ, ナリンゲニン、エリオディクトイルの1つ又は複数に作用するフラボノイド経路のヒドロキシ化酵素を包含する。

好ましくは、DHK ヒドロキシ化酵素は3', 5'-ヒドロキシラーゼである。しかしながら、この酵素をコードする遺伝子配列をクローン化するために使用される方法は、3'-ヒドロキシラーゼのごとき酵素をコードする他の遺伝子配列を単離するために使用することもできよう。従って、この明細書において3', 5'-ヒドロキシラーゼの単離及びクローニングへの言及は3'-ヒドロキシラーゼのごとき他のフラボノイドヒドロキシ化酵素への言及を包含すると理解されるべきである。

「核酸単離体」なる用語は、非天然存在状態にある遺伝子配列を意味する。これは一般に、その天然状態から分離されていること、又はその天然環境において必ずしも遭遇しない方法により形成されたことを意味する。さらに具体的には、それはインビトロで形成され又は維持される核酸分子、組換え又は合成分子、及び異種核酸と組合わされた核酸を包含する。それはまた、他の核酸配列に比べて少なくとも部分的に精製された後の天然配列に拡張される。

本明細書において使用する場合、「遺伝子配列」とは、DHK ヒド

ロキシ化酵素、例えば3', 5'-ヒドロキシラーゼ中のアミノ酸の配列を直接的に特定するか又は塩基の相補的連続を介して特定するヌクレオチド塩基の連続を意味する。核酸又はその相補形は全長酵素又はその誘導体もしくは部分をコードすることができる。

「誘導体」とは、天然酵素に対する任意の単一の又は複数のアミノ酸置換、除去及び/又は付加を意味する。これに関し、核酸は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする天然核酸配列を含み、あるいは該天然配列に対して1又は複数のヌクレオチド置換、除去及び/又は付加を含んでいてもよい。本明細書において予定される核酸配列はまたは遺伝子プローブとして又は植物における対応する遺伝子の発現を制御することができる「アンチセンス」分子として有用なオリゴヌクレオチド配列を包含する。従って、核酸又はその相補形が3', 5'-ヒドロキシラーゼの「部分」をコードする場合、この様な核酸分子はオリゴヌクレオチドプローブとしてあるいはポリメラーゼ連鎖反応のための又は種々の変異誘発技法におけるプライマーとして有用であろう。

本発明のDHK ヒドロキシ化酵素のそして特に3', 5'-ヒドロキシラーゼのアミノ酸挿入誘導体には、アミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合体並びに単一アミノ酸又は複数のアミノ酸の配列内挿入体が含まれる。挿入アミノ酸配列変形体は蛋白質中の所定の部位に1又は複数のアミノ酸残基が導入されたものであるが、得られる生成物の適切なスクリーニングを用いればランダム挿入も可能である。除去変形体は、配列からの1又は複数のアミノ酸の除去により特徴付けられる。置換アミノ酸変形体は、配列中の少なくとも1個の残基が除去されそしてその位置に異なる残基が挿入されているものである。典型的な置換は、次の表1に行って作られるものである。

表 1

アミノ酸置換のための適当な残基

もとの残基	置換の例
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

3', 5'-ヒドロキシラーゼがアミノ酸置換によって誘導体化される場合、アミノ酸は一般に、類似の性質、例えば疎水性、親水性、電子陰性、大きい側鎖等を有する他のアミノ酸により置き換えられる。アミノ酸置換は典型的には単一残基によるものである。アミノ酸挿入は通常約1〜10アミノ酸残基のオーダーであり、そして

除去は約1〜20残基の範囲である。好ましくは、除去又は挿入は隣接対において、すなわち2残基の除去又は2残基の挿入として行われる。

前記のアミノ酸変形体は、当業界においてよく知られているペプチド合成技法例えば固相合成法 (Merrifield, 1964) 等を用いて、又は組換えDNA 操作により作ることができる。既知の又は部分的に知られた配列を有するDNA の所定の部位に置換変異を行う方法はよく知られており、そして例えばM13 変異誘発法を包含する。置換、挿入又は除去変形体として現われる変形体蛋白質を製造するためのDNA 配列の操作は、例えばSambrookら (1989) に従来から記載されている。

本発明の3', 5'-ヒドロキシラーゼの組換え又は合成変形体及び誘導体の他の例には、該酵素と関連する任意の分子、例えば炭水化物、脂質及び/又は蛋白質もしくはポリペプチドの1又は複数の置換、除去及び/又は付加が包含される。

「類似体」及び「誘導体」なる用語はまた、3', 5'-ヒドロキシラーゼの任意の機能的化学的同等物にそしてさらに前記のアミノ酸誘導体に拡張される。

本発明の核酸は、リボ核酸又はデオキシリボ核酸であることができ、単鎖又は二本鎖であることができ、そして直鎖状又は共有結合により閉じられた環状分子であることができる。本発明はまた、低い、好ましくは中程度のそして最も好ましくは高いストリンジェンシー条件下で本発明により予定される核酸分子とハイブリダイズする他の核酸分子に拡張される。他の用語で表現すれば、本発明は、図9もしくは図10に示されるヌクレオチド配列を有する核酸分子に、あるいはヌクレオチド又はアミノ酸配列のレベルにおいて少なくとも35%、好ましくは少なくとも45%、さらに好ましくは少なくとも

55%、さらに好ましくは少なくとも65~70%、そして一層好ましくは85%以上の類似性を有する分子(ここで、核酸は3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有する酵素をコードするか又はそれをコードする配列に相補的である)に拡張される。しかしながら、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列は前記の%より低い類似性を有しそしてなおDHK ヒドロキシル化酵素をコードすることができ、そしてこの様な分子もそれらが相同性の領域を保存している場合には本発明の範囲内に考えられることに注目すべきである。本発明はまた、低い、好ましくは中程度のそして最も好ましくは高いストリンジェンシー条件下で、上に予定された核酸分子の部分とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプライマーの形の核酸分子に拡張される。

ここに予定される核酸分子は単独で存在することもでき、又はベクター分子そして好ましくは発現ベクターとの組合せにおいて存在することもできる。この様なベクター分子は真核細胞及び/又は原核細胞中で複製しそして/又は発現する。好ましくは、ベクター分子又はその部分は植物ゲノムに組み込まれ得る。核酸分子はまた、植物細胞中での核酸分子の発現を指令することができるプロモーター配列を含むことができる。核酸分子及びプロモーターは、任意の手段により、例えばエレクトロポレーション又はアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)仲介移行により細胞に導入され得る。

ペチュニアは今日最も便利で且つ好ましい材料源を代表するので、本発明はペチュニア由来の核酸配列を用いて例示される。しかしながら、当業者は、他の植物又はある種の微生物のごとき任意の分離源から類似の配列が単離され得ることをただちに理解するであろう。3'-ヒドロキシラーゼの遺伝特性はキンギョソウ(*Antirrhinum*)、バーベナ(*Verbena*)及びペチュニア(*Petunia*)の花並びにトウモロ

コシの実生及び糊粉層において知られている(Heller及びForkmann, 1988)。遺伝子 eos はキンギョソウ(*Antirrhinum*)において3'-ヒドロキシラーゼを調節し(Forkmann及びStotz 1981)、他方 $Ht1$ 遺伝子及び Pr 遺伝子はそれぞれペチュニア(*Petunia*)(Stotzら、1985)及びトウモロコシの糊粉層(Larson及びBussard, 1986)において同様の酵素を調節する。例えば、バーベナ・ハイブリダ(*Verbena hybrida*)の化学遺伝学的(chemogenetic)研究が示すところによれば、この植物において、アントシアニンのB環の3'及び5'の両位置におけるヒドロキシル化は1つの遺伝子により調節される(Beale, 1940)。3', 5'-ヒドロキシル化の酵素活性はデルフィニジン(delphinidin)生産株の花の抽出物中にのみ存在する(Stotz 及びForkmann, 1982)。3'及び5'位におけるヒドロキシル化のためのNADPH-依存性ミクロソーム酵素活性はまたカリステプス(*Callistephus*)及びラチルス(*Lathyrus*)の花抽出物中に証明された(Forkmann, 1991)。V.ハイブリダ(*V. hybrida*)の場合と同様に、フラバノン類及びジヒドロフラバノン類の3', 5'-ヒドロキシル化のための酵素活性は花に3', 4', 5'-ヒドロキシル化されたフラボノイド化合物(又はそれらのメチル化誘導体)を含有する株の花抽出物中にのみ存在することが見出された。従って、3', 4', 5'-ヒドロキシル化フラボノイド類の生成は明らかにフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性に依存する。

3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子は、カリステプス(*Callistephus*)(R)、ペチュニア(*petunia*)($Hf1$, $Hf2$)及びバーベナ(*Verbena*)(P)を含めて多くの觀賞用植物において、デルフィニジンを生産することができない対応する変異株の存在によって同定されている。さらに、各酵素活性が証明されている(Forkmann, 1991)。3', 5'-ヒドロキシラーゼはまたミクロソ

ームのシトクロムP450酵素であると考えられた(Heller及びForkmann, 1988)。しかしながら、これらの及び他の植物種からの3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子のクローニングの公表された報告は存在しない。

3', 4', 5'-ヒドロキシル化フラボノイド又はそれらの誘導体を生産することができる他の植物種には、アジサイ(*Kakedu*ら、1985)、ヒエンソウ(*Asen*ら、1975)、リシアンサス(*Lisianthus*)(*Asen*ら、1986)、トマト(*von Wettstein-Knowles*, 1986)及びポテト(*Harborne*及び*Simmonds*, 1968)が含まれる。これらの種又は3', 4', 5'-ヒドロキシル化フラボノイドを生産することができる他の植物もまた3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子の単離源として適当であろう。フラボノイド経路の酵素(例えば、3', 5'-ヒドロキシラーゼ)を直接又は間接にコードするこの様なすべての核酸配列は、その由来に関係なく本発明に含まれる。

同様に、本明細書に略記する遺伝子クローニング法を用いて、3', 4', 5'-ヒドロキシル化フラボノイド類を生産する他の植物から3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子を単離することができる。実験手順の些細な変更は要求されるかもしれないが、本明細に記載するのと同じ技法を用いて、類似の遺伝子配列を検出し、単離しそしてクローン化するためにここに開示されるクローン及びオリゴヌクレオチドを用いることができる。その様な些細な変更のすべてが本発明に含まれる。3', 5'-ヒドロキシラーゼのごとき酵素の他の適当な入手源の例には、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー及びナスが含まれる。

本発明に従えば、3', 5'-ヒドロキシラーゼのごときDHK ヒドロキシル化酵素をコードする核酸配列をトランスジェニック植物

に導入しそして発現させ、それにより、植物細胞中で合成されるなら、DHK 及び/又は他の適当な基質を、最終的に、アントシアニジンのアントシアニン誘導体、例えばデルフィニジン、ペチュニジン又はマルビジン(malvidin)に転換することができる。これらのアントシアニンの生産は青色及び青緑色の種々の色相の形成に寄与する。植物における核酸配列の発現は構成的、誘導的又は発生段階に依存的(developmental)であることができる。

従って、本発明の他の観点には組換えDHK ヒドロキシル化酵素又はその活性変異体もしくは誘導体を発現することができるトランスジェニック植物の製造方法を提供し、この方法は適当な植物の細胞に前記DHK ヒドロキシル化酵素をコードするヌクレオチド配列を含んで成る核酸を、該核酸分子の最終的発現を最終的に許容する条件下に導入し、トランスジェニック植物を該細胞から再生し、そして該トランスジェニック植物を、前記核酸の発現を可能にするのに十分な期間及び条件で生長せしめることを含んで成る。

好ましい態様において、本発明は変化した開花を発現するトランスジェニック花植物の製造方法を含み、この方法は、適当な植物の細胞に、本発明の核酸配列を該核酸の最終的発現を許容する条件下に導入し、該細胞からトランスジェニック植物を再生し、そして該核酸配列のDHK ヒドロキシル化酵素への発現を可能にするために十分な時間及び条件で生長せしめることを含んで成る。

好ましくは、DHK ヒドロキシル化酵素は3', 5'-ヒドロキシラーゼであり、発生段階に依存的(developmental)に制限され、そして変化した花は受容体植物の生理的条件に依存して青色もしくは赤色の花又は他の色の色相の生成を誘導する。「適当な植物」とは、3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素のための基質を生産することができ、そして所望の色の発生のために必要な適当な生理的性質及び

遺伝子型を有することができる植物を意味する。これはバラ、ペチュニア、カーネーション、キク及びガーベラを包含するがこれに限定されない。幾つかの植物種においては、平均花弁液胞pHより高いpHを有する品種として定義される「高pH系」を選択することが望ましいであろう。組換え3', 5'-ヒドロキシラーゼ又はその変異体及び誘導体の類は前記した通りであり、そしてペチュニア、パーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来の酵素を含む。

当業者は、この方法に適用可能な変法、例えば他の植物に天然に存在する酵素の発現の増加又は減少を認識するであろう。これは色の異なる色相、例えば青又は赤の異なる色相を導くであろう。

他の酵素、例えば3', 5'-ヒドロキシラーゼの活性を低下させるため、この酵素又はその種々の部分をコードする核酸配列をアンチセンス配向において使用することができるであろう。本発明はいずれか1つの理論に限定することを望むわけではないが、この様なアンチセンス核酸配列は酵素について特定される天然mRNAの全部又は部分とデュプレックスを形成する可能性がある。あるいは他の核酸配列を不活性化するためにリボザイムを使用することができる。

従って本発明は、組換えシヒドロカンフェロール (DHK) ヒドロキシル化酵素を発現することができるか、又はDHK ヒドロキシル化酵素に翻訳され得るmRNA分子の全部又は部分に実質的に相補的な核酸配列の転写を指令するトランスジェニック植物の製造方法に拡張され、この方法は、適当な植物の細胞に、請求項1又は6に記載の核酸単離体を、該核酸単離体の最終的発現を許容する条件下に導入し、該細胞からトランスジェニック植物を再生し、そして該核酸単離体の発現を可能にするのに十分な時間及び条件で該トランスジェニック植物を生長せしめることを含んで成る。この態様において、適当

な受容植物は特にアイリス、チューリップ、ユリ、リシアンサス (Lisianthus)、フリージア、ヒエンソウ、リモニウム (Limonium) 及びペラルゴニウム (Pelargonium) に拡張される。

従って、トランスジェニック植物を製造するための上記の方法は、アンチセンスmRNA又はオリゴヌクレオチドをコードする遺伝子又はDNA断片を、3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードするか又はこれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列のすべて又は部分又は領域に導入するという別法に拡張される。

従って、本発明は、本発明の核酸配列のすべて又は部分、あるいはそのアンチセンス形、及び/又はその任意の同族体又は変化した形を含有するすべてのトランスジェニック植物、そして特に変化した花を示すトランスジェニック植物に拡張される。従って、トランスジェニック植物は、DHK ヒドロキシル化酵素をコードするか又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る安定に導入された核酸分子を含有し、そして特に、上記のような導入された核酸配列を単離する高pH植物系である。本発明はまた、この様なトランスジェニック植物からの種子に関する。この様な種子は、特に着色されていれば、植物のための所有標識として有用であろう。

本発明のさらなる観点は、DHK が水分解酵素の組換え形、特に組換え3', 5'-ヒドロキシラーゼに向けられる。本酵素の組換え形は、例えば、さらに活性な酵素を開発するための研究用材料源を提供し、そして着色された化合物の製造のためのインビトロ系を開発するために有用であろう。

本発明の他の観点は、植物からのシトクロムP450分子又は類似の分子をコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子のクローニング方法を含み、この方法は、既知ミクロソームのシトクロムP450分子の1又は複数

のコンセンサス配列に由来するヌクレオチド配列を有する1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応による前記植物の細胞からの核酸分子の適当な調製からのクロモソームP450ヌクレオチド配列又は相補的配列の増幅を含んで成る。

関連する態様において、シトクロムP450核酸分子又はその相補的配列をクローニングする方法は、適当なcDNAライブラリーから既知のシトクロムP450分子の1又は複数のコンセンサス配列に対応する1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーにハイブリダイズすることができるクローンを選択することを含んで成る。

好ましくは、コンセンサス配列の1つはシトクロムP450分子のヘム結合ドメインからのものであり、さらに好ましくはF(G.S.)XGXRXCXG (ここでXは任意のアミノ酸である) 又はPGFAGRRICPGである。最も好ましい態様において、クローニングされるべき核酸は、DHK ヒドロキシル化酵素、そして特に3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的である。さらに好ましくは、3', 5'-ヒドロキシラーゼは前に記載したようなものであり、そしてさらに詳しくは図9又は図10に示すようなアミノ酸配列を有するか又はヌクレオチド配列によりコードされ、あるいは前に定義したようにそれに類似性を有する。

次に、図及び例に言及しながら本発明をさらに記載するが、それらに限定されるものではない。

図1(A)及び(B)はフラボノイド色素の生合成経路の模式図である。経路の最初の部分に参与する酵素は次のように表示されている。PAL = フェニルアラニン・アンモニアリアーゼ; C4H = シンナメート・4-ヒドロキシラーゼ; 4CL = 4-カルマレート; CoA リアーゼ; CHS = カルコンシンナーゼ; CHI = カルコンフラボニソメラーゼ; F3H = フラバノン・3-ヒドロキシラーゼ; DFR = ジ

ヒドロフラボノール-4-レダクターゼ; UFGT = UDP-グルコース:フラボノイド-3-O-グルコシルトランスフェラーゼ。後の段階はP. ハイブリダ (P. hybrida) の花において起こる変換に対応し、そして1 = シアニジン-3-グルコシド及びデルフィニジン-3-グルコシドのグルコシル残基へのラムノース糖の付加; 2 = アシル化及び5-O-グルコシル化; 3 = 3'-メチル化; 4 = 5'-メチル化; 5 = 3', 5'-メチル化を含む。

図2(A)は、P. ハイブリダcv V23 (Hf1/Hf1, Hf2/Hf2) の花弁抽出物中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性、及びP. ハイブリダcv R51 (hf1/hf1, hf2/hf2) における3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性の失損を示す。3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は³H-ナリンゲニンの3'-及び3', 5'-ヒドロキシル化誘導体エリオジクチオール (eriodictyol) 及びペンタヒドロキシフラバノンへの転換により検出された。この図の左側に、反応の基質ナリンゲニン並びに3'-ヒドロキシラーゼ生成物エリオジクトール及び3', 5'-ヒドロキシラーゼ反応の生成物ペンタヒドロキシフラバノンが示されている。TLCプレート上の基質及びヒドロキシル化生成物の位置がこの図の右側に示されており、これは左から右に、P. ハイブリダcv V23及びP. ハイブリダcv R51からの花の花弁抽出物により生成される反応生成物並びにNADPHが反応混合物から省略された場合にナリンゲニンのヒドロキシル化が生じないことを示す対照のオートラジオグラフを示す。

図2(B)は、異なる発達段階におけるP. ハイブリダcv Old Glory Blue (OGB) 花の花弁抽出物中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を示す。左から右に、TLCプレートのオートラジオグラフは(1) 段階1の花 (未着色、閉じたつぼみ (長さ<25mm)); ナリンゲニンから3', 5'-ヒドロキシル化誘導体ペンタヒドロキシ

フラバノンへの限定的な転換、(2) 段階2の花(着色、閉じたつぼみ(長さ25~35mm):より高い3', 5'-ヒドロキシラーゼレベルを示す、ペンタヒドロキシフラバノンへの増加した転換、(3) 段階3の花(出現しつつある花冠を伴う濃紫のつぼみ(長さ>35mm)):最高3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性、(4) 段階4の花(濃紫の開いた花、蒴裂開前(長さ>50mm)):最高3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性、(5) 段階5の花(十分に開いた花。すべての蒴裂開):検出可能なレベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼなし。

図3(A)はシトクロムP450をコードするmRNA分子の模式的表示である。黒くした領域は、ヘム結合ドメインをコードする配列の相対位置を示す。このドメインの最も保存された領域のコンセンサスアミノ酸配列は1文字コードを用いて示されている。SWISS-PROTデータベース中に存在するシトクロムP450配列の100%に存在するアミノ酸は箱で囲まれており、そしてXは低レベルの配列の保存が存在する位置を示す。

図3(B)は、cDNAライブラリー#1からのシトクロムP450分子pCGP450及びpCGP454のPCR増幅のために使用されたオリゴの部分を示す。オリゴ1及び3は保存されたヘム結合ドメイン中の配列をカバーし、他方オリゴ2及び4はそれぞれpBluescript(Stratagene)-20及び逆プライマー配列に対応した。オリゴ1及び2はpCGP450中のcDNA挿入部を合成するために用いられ、オリゴ3及び4はpCGP454中のcDNA挿入部を合成するために使用された。一般化されたcDNA分子の表示は図3Aに示されるものと同じであり、ベクター配列は薄い陰により示されている。

図4(A)は、pCGP174及びpCGP175を含めてシトクロムP450同族体を同定するためにcDNAライブラリー#1をプローブするのに用い

たDNA断片の模式的表示である。P450=黒い箱により示されるヘム結合ドメイン(Haem)を伴う、一般化されたシトクロムP450cDNA:断片1=900bp断片は鑄型としてpCGP142 DNAを用い、オリゴ5及び6を用いるPCRにより得られ;断片2=1.2Kb断片は、pCGP147のSalI-EcoRI消化により単離され;断片3=750bp断片は鑄型としてpCGP158 DNAを用い、オリゴ4及び7を用いるPCRにより得られ;断片4=670bp断片は、pCGP160のPstI-EcoRV消化により単離され;断片5=150bp断片は鑄型としてpCGP454 DNAを用い、オリゴ3及び4を用いるPCRにより得られた。すべての精製された断片は「材料及び方法」の項に記載したようにして³²P-dCTPによりラベルした。

図4(B)~(H)は、(i)pCGP142、(ii)pCGP147、(iii)pCGP158、(iv)pCGP160及び(v)pCGP454からのcDNA挿入部についての部分ヌクレオチド配列及び対応する推定アミノ酸翻訳生成物を示す。cDNAライブラリーをプローブしてpCGP174及びpCGP175を単離するために使用した領域は矢印で示されている。

図5(A)及び(B)はそれぞれプラスミドpCGP174及びpCGP175のダイアグラム表示である。cDNA挿入部は中空箱で示されており、仮定的ヘム結合ドメインをコードする領域は黒箱で示されている。両cDNA挿入部のEcoRI部位は5'-末端にあり、そしてXhoI部位は3'-末端にある。

図6(A)はpCGP174 cDNA挿入部の3'-領域によりプローブされたDNAプロットのオートラジオグラフである。各レーンは次のベチューニア組織から単離された全RNAの20μgのサンプルを含んだ。1~5は、「材料及び方法」の項に記載する花の発生段階の5つの異なる段階(1~5)におけるOGBの周縁(limb)組織であり;Tは、段階3~4の花からのOGBの管組織であり;Lは、OGBの6週間の

実生からの葉組織であり;ILは、OGBの6週間の実生からのグルコース/高光処理された葉組織であり;V23は段階3~4の花からのV23の周縁(limb)組織であり;R51は段階3~4の花からのR51花冠組織であり;VRは、V23,R51のF₂雑種の段階3~4の花からの花弁周縁組織であり;Sw63は、Sw63の段階3~4の花からの花弁周縁組織であり;そしてTh7は、Th7の段階3~4からの花弁周縁組織である。

図6(B)はV23,R51(V/R)F₂植物のRFLP分析からの代表的なオートラジオグラフである。XbaIで消化されたゲノムDNAがpCGP174の3'-領域によりプローブされた。プローブに強くハイブリダイズするV23断片が、花の管組織中で3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性(+)を有するすべてのF₂植物において検出された。強くハイブリダイズするバンド(RFLP#1)についてのRFLP判定が種々の植物について示された。V:V23-様RFLP, R:R51-様RFLP, H:ヘテロ接合性(VR)。

図7(A)はpCGP175 cDNA挿入部の3'-領域によりプローブされたRNAプロットのオートラジオグラフである。各レーンは次のものから単離された全RNAの20μgのサンプルを含有した。1~5は、「材料及び方法」の項に記載する花の発達の5つ(1~5)の異なる段階における花のOGBの周縁組織であり;Tは段階3~4の花からのOGBの管組織であり;Lは、OGBの6週間の実生からの葉組織であり;ILは、OGBの6週間の実生からのグルコース/高光処理された葉組織であり;V23は、段階3~4の花からのV23周縁組織であり;R51は段階3~4の花からのR51花冠組織であり;VRは、V23,R51のF₂雑種の段階3~4の花からの花弁周縁組織であり;Sw63は、Sw63の段階3~4の花からの花弁周縁組織であり;そしてTh7は、Th7の段階3~4の花からの花弁周縁組織である。

図7(B)は、V23,R51(V/R)F₂植物のRFLP分析からの代表的なオートラジオグラフである。XbaIで消化したゲノムDNAをpCGP175の3'-領域によりプローブした。pCGP175プローブを用いて得られるRFLP判定はchi-Aプローブを用いて帰属されるpo判定と同じであった。V:V23-様RFLP, R:R51-様RFLP, H:ヘテロ接合性(VR)RFLP。

図8は、pCGP602の制限酵素地図のダイアグラム表示である。クロニングに用いたベクターを除くcDNA挿入部の長さが、太線で示される。これらはM13-mp18及びmp19にサブクロニングされ、そして示されるオリゴヌクレオチドプライマー配列を用いて配列決定され、オーバーラップする配列情報が得られた。各サブクローンの断片から得られた配列情報の範囲及び方向を半矢印を付した線により示す。S1=プライマー配列1:S2=プライマー配列2:S3=プライマー配列3。ATGはメチオニン開始コドンを示し、クローンの長さ(塩基対)も示される。

図9(A)~(D)はpCGP176及びpCGP602からのcDNA挿入部のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を示す。pCGP602からの挿入部は、示される全配列を含む。pCGP176挿入部の5'-末端が矢印により示される。

図10(A)~(C)はpCGP175からのcDNA挿入部のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を示す。

図11はpCGP618の作製のダイアグラム表示である。pCGP618は、発現ベクターpYGA22m中の酵母グリセアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター(PGPD)の後にpCGP175 cDNA挿入部をセンス方向にクロニングすることにより作製された。pCGP175からのcDNA挿入部をEcoRI-KpnI断片として、pYGA22mのEcoRI/KpnI消化から生ずる大断片と連結した。E=EcoRI, H=HindIII, K=KpnI。

X=XhoI, IR=2 μm プラスミドの逆転反復, TrpI=TrpI遺伝子, Ap=アンピシリン耐性マーカー。

図12(A)は、基質として³H-ナリンゲニンを使用しての酵素抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618により形質転換された酵母の抽出物による、³H-ナリンゲニンの3', 5'-ヒドロキシ化誘導体ペンタヒドロキシフラバノンへの転換を示す(1及び2)。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった(C)。OGBの3', 5'-ヒドロキシラーゼによるナリンゲニンのペンタヒドロキシフラバノンへの転換も示される(OGB C)。

図12(B)は、基質として³H-ジヒドロケルセチン(dihydroquercetin)を使用しての、酵母抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618により形質転換された酵母の抽出物による³H-ジヒドロケルセチン(DHQ)の³H-ジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)(DHM)への転換を示す(1及び2)。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった(C)。OGBの3', 5'-ヒドロキシラーゼによるDHQのDHMへの転換も示される(OGB C)。

図13は、基質として³H-ナリンゲニンを用いての酵母抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618及びpCGP620により形質転換された酵母の抽出物による、³H-ナリンゲニンの3', 5'-ヒドロキシ化誘導体ペンタヒドロキシフラバノンへの転換を示す(それぞれ、1及び2)。pCGP620抽出物から得られた反応生成物はさらに3'-ヒドロキシ化エリオジクテオール(eriodictyol)及びもとのナ

リンゲニン基質の残りを含んでおり、3', 5'-ヒドロキシ化最終生成物への転換が不完全であることが示された。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった。

図14は、プラスミドpCGP90のダイアグラム表示である。示されるように、pCGP602からのcDNA挿入部が発現ベクターpCGP293のMacプロモーターの後にセンス方向にクローニングされている。

図15は、ペチュニアの花弁抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、Skr4 x Sw63の花弁組織(L)中に低レベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性(³H-ナリンゲニンの³H-ペンタヒドロキシフラバノンへの転換)が存在することを示している。2種類のSkr4 x Sw63/pCGP90トランスジェニック(T/G 1602及びT/G 1603)の円周組織(L)中に有意に高レベルの活性が検出された。非トランスジェニックSkr4 x Sw63細胞又は2種類のpCGP90トランスジェニックのいずれの花弁管(T)の抽出物にも3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性が検出されなかった。OGBの組織(L)及び管(T)花弁組織の抽出物による、ナリンゲニンのペンタヒドロキシフラバノンへの転換も示される。

図16は、³²P-ラベルされたHf1 cDNAによりプローブされたRNAプロットのオートラジオグラフの写真表示である。各レーンは、(1) P、ハイブリダ(P. hybrida) cv. OGBの花弁、(2) パンジーの花弁、(3) ジャガイモの茎、(4) ナスの皮、(5) ニコチアナ・アラト(Nicotiana glauca)の花、(6) アゲラツム(Ageratum)の花から単離された全RNAの20 μgのサンプルを含有した。A及びCのために使用したプローブは660bp BalI DNA断片に由来し、1.4Kb EcoRI/HindIII断片をCのために使用した。使用した洗浄条件は、(A) 55℃にて6xSSC、(B) 50℃にて2xSSC、(C) 65℃にて

0.2xSSCであった。

図17は、³²P-ラベルHf1 cDNAによりプローブされたサザンプロットのオートラジオグラフの写真表示である。各レーンは、EcoRIで消化された10 μgのDNAを含有した。DNAサンプルは、(1) ナス、(2) オランダアイリス、(3) ジャガイモ、(4) スミレ及び、(5) アネモニから単離された。洗浄条件は、(A) 50℃にて6xSSC、及び(B) 65℃にて2xSSCであった。

実施例

1. 材料及び方法

化学物質酵素及びラジオアイソトープ

エリオジクテオール(eriodictyol)及びジヒドロケルセチン(dihydroquercetin)はCarl Roth KGから入手し、そしてナリンゲニンはSigmaから入手した。ジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)はVercrassseら(1985)の方法によりミリセチン(myricetin)から化学的に合成した。³H-ナリンゲニン(5.7Ci/mole)及び³H-ジヒドロケルセチン(12.4Ci/mole)はAmershamから入手した。すべての酵素は市販品であり、そして製造者の指示に従って使用した。

細菌株

使用した大腸菌(*Escherichia coli*)株は次の通りであった。

DH5a	supE44, Δ(lacZYA-ArgF)U169, φ80lacZΔM15, hsdR17(r ⁻ , m ⁻), recA1, end A1, gyrA96, thi-1, relA1, deoR, (Hanahan, 1983及びBRL, 1986).
XL1-Blue	supE44, hsdR17(r ⁻ , m ⁻), recA1, end A1, gyrA96, thi-1, relA1, lac ⁻ , [F' proAB, lacI ⁺ , lacZΔM15, Tn10(tet ^r)] (Bullockら, 1987).
PLK-F'	recA, hsdR17(r ⁻ , m ⁻), mcrA ⁻ , mcrB ⁻ , lac, supE44, galK2,

galT22, metB1, [F' proAB, lacI⁺, lacZΔM15, Tn10(tet^r)] (Stratagene).

無力にされた(disarmed)アグロバクテリウム・ツメファシエンズ(*Agrobacterium tumefaciens*) AGLO株(Lazoら, 1991)はR. Ludwig(カリフォルニア大学生物学部、サンタクルツ)から入手した。

クローニングベクターpBluescript及びpBluescribeはStratageneから入手した。

大腸菌及びA. ツメファシエンズの形質転換

大腸菌DH5 α細胞の形質転換はInoueら(1990)の方法に従って行った。コンピテントAGLO細胞を、50mL MG/L培地(文献)に接種後28℃で16時間培養して調整した。その100 μLに5 μgのプラスミドDNAを加えることにより、プラスミドpCGP90(図14)をアグロバクテリウム・ツメファシエンズAGLO株に導入した。次に、細胞をペレット化し、そして0.5mLの85% (v/v) 100mM CaCl₂/15% (v/v) グリセロール中に再懸濁した。液体N₂中で2分間インキュベートすることによりDNA-アグロバクテリウム混合物を解凍し、そして次に37℃にて5分間のインキュベーションにより凍結した。次に、DNA/細菌混合物をさらに10分間氷上に置いた。次に、細胞を1mLのMG/L培地に加え、そして28℃にて16時間振とうしながらインキュベートした。pCGP90を有するA. ツメファシエンズの細胞を、100 μg/mLのゲンタマイシンを含有するMG/L寒天プレート上で選択した。ゲンタマイシン耐性形質転換体から単離されたDNAのサザン分析によりpCGP90の存在を確認した。

使用したペチュニア・ハイブリダ(*Petunia hybrida*)の品種を表2に示す。

表 2
植物材料

植物品種	性 質	由来/文献
Old Glory Blue (OGB) F ₁ Hybrid		Ball Seed, USA
V30	An1, An2, An3, An4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1 Ph2, Ph3, Ph4, Ph5, Hf1, Hf2, Ht1, Ht2, Rt, Mt1, Mt2, mf1, po, Gf	Koesら(1986)
V23	An1, An2, An3, An4, An6 An8, An9, An10, ph1, Hf1, Hf2, ht1, Rt, Po, Bl, Fl	Wallrothら(1986) Doodemanら1984
R51	An1, An2, An3, an4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1, ht1, hf2, Ht1, rt, po, bl, fl	Wallrothら(1986) van Tunen ら(1990) Doodemanら(1984)
Sw63	An1, An2, An3, an4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1, Ph2, Ph5, hf1, hf2 ht1, ht2, rt, po, mf1, fl, Gf	I. N. R. A., Dijon, Cedex, フランス Doodemanら(1984)
Th7	An1, An2, An3, An4, An6 An9, An10, An11, Hf1, Hf2, Ht1, Ht2, Ph1, Ph2, Ph5, Rt, po, mf1, mf2, Gf, fl	I. N. R. A., Dijon, Cedex, フランス

ウム (pH7.5), 1 mM EDTA, 0.25M シュクロース, 0.25M マンニトール, 0.1% (v/v) BSA, 100nM ペプスタチン, 100nM ロイペプチン, 0.1 mg/mL PMSP, 20mM 2-メルカプトエタノール及び10 mg/mLポリクラ (polyclar) AT) 中でホモゲナイズした。ホモジネートを10,000rpm にてJA20ローター (Beckman) 中で4℃にて10分間遠心し、そして上清の一部を3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイ

3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素の活性は、Stotz 及びPorkmann (1982) により記載された方法の変法を用いて測定した。アッセイ反応混合物は典型的には100 µLの抽出抽出物、5 µLの50mM NADPH/アッセイ緩衝液 (100mM リン酸カリウム (pH8.0), 1 mM EDTA, 及び20mM 2-メルカプトエタノール)、及び10 µCiの (³H) ナリンゲニン又は5 µCiの (³H) ジヒドロクエルセチンを含有しており、そしてアッセイ緩衝液により最終体積210 µLにした。23℃にて2~16時間のインキュベーションの後、反応混合物を0.5 mLの酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル相を真空乾燥し、そして10 µLの酢酸エチルに再懸濁した。トリチル化されたフラボノイド分子をセルロース薄層プレート (メルクArt5577, 独逸) 上で、クロロホルム/酢酸/水 (10:9:1 v/v) 溶剤系を用いて分離した。クロマトグラフィの完了の際、TLC プレートにエーテル中7% (v/v) 2, 5-ジフェニルオキサゾールを噴霧した。反応生成物をオートラジオグラフィにより局在化し、そして反応生成物と並んで泳動されそしてUV光のもとで可視化された、非-放射性ナリンゲニン、エリオジクチオール、ジヒドロクエルセチン及びジヒドロミルセチン標準との比較により同定された。

Skr4	An1, An2, An3, An4, An6 An11, hf1, hf2, ht1, Ph1, Ph2, Ph5, rt, Po, Mf1, Mf2, fl	I. N. R. A., Dijon, Cedex, フランス
Skr4 x Sw63	Skr4 x Sw63 F ₁ 雑種	
Rw14	An1, An2, An4, Ph1, ph2, Ph5, hf1, hf2, Ht1, Rt, Po, Bl, Lgl, Lul, Vsl, Vs3, Vs5, la, Ygl, ws, Gf, Mt1, Mf2, fl	I. N. R. A., Dijon, Cedex, フランス
Rp57	An1, An2, An4, Ph1, ph2, Ph5, hf1, hf2, Ht1, Rt, Po, Mt, Mf, fl, Gf, Bl, Lgl, Lul, Vsl, Vs3, Vs5, Ygl, Ws.	I. N. R. A., Dijon, Cedex, フランス
Rp57 x Rw14	Rp57 x Rw14 F ₁ 雑種	

植物を特別の成育室で、1日14時間10,000ルクスの光強度及び22~26℃の温室にて成育させた。OGBの花を次に定義する発生段階において収穫した。

段階1: 着色なし、つぼみが閉じている (長さ<25mm)

段階2: 着色あり、つぼみが閉じている (長さ25~35mm)

段階3: 暗紫色のつぼみ、花冠が生じつつある (長さ>35mm)

段階4: 暗紫色開花、蒴裂開前 (長さ>50mm)

段階5: 十分に開花、すべての蒴裂開

表2に記載する他の品種の花を、最大色素蓄積の段階で蒴の開裂前に収穫した。

3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのための植物抽出物の調製

植物組織を2~5倍体積の水冷した抽出緩衝液 (100mM リン酸カリ

葉におけるデルフィニジン合成のグルコース/高光誘導

葉をP₁ ハイブリッドcv.OGBから収穫し、そして無菌水中で1cm²に切った。次に、葉片を2% (w/v) グルコース溶液上に浮かせ、そして24,000ルクスの光強度に96時間暴露した。

cDNAライブラリー#1の作製

段階3~4のOGBの花の周縁20gを、10mMバナジリルポヌクレオシド錯体を含むPEB (200mM Tris-HCl (pH8.6), 60mM KCl, 30mM MgCl₂, 25mM EGTA) 100mL 中でホモゲナイズした。ホモジネートを無菌のMiracloth (Calbiochem) に通して濾過することにより細胞片を除去した。濾液を、Ultra-Clear™ Quick-Seal™ (Beckman) 遠心チューブ中、25% (w/v) シュクロース及び250ユニットのInhibitAce (5-Prime 3-Prime) を含有する8mLのPEB、並びに50% (w/v) シュクロース及び250ユニットのInhibitAceを含有する6mLのPEBの段階的勾配の上部に重層した。チューブを70Tiローター中で26,000rpm にて3.5時間遠心した。25% (w/v) シュクロース/50% (w/v) シュクロース界面から膜結合ポリゾームを集め、そして4Mイソチオシアン酸グラニジン溶液に加えた。Turpen及びGriffith (1986) により記載されているようにして5.7M CsCl クッションを通してベレット化することによりRNAを変性したポリゾームから単離した。

Uni-ZAP™ XR ベクターキット (Stratagene) を使い、鋳型としてポリゾームRNAを25µg使用してλZAP中にディレクショナルcDNAライブラリーを作製した。250,000 プラーク形成ユニット (pfu) を含有する一次ライブラリーをNZY プレート (Sambrookら, 1989) 上で一夜増殖により増幅し、そして増幅されたファージストックをSambrookら (1989) により記載されているようにしてPSB (100mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.001% (w/v) ゼラ

チン)中に抽出した。

cDNAライブラリー#2の作製

全RNAを、P. ハイブリダ cv. OGBの段階3~4の花の花卉組織から、Turpen及びGriffith (1986)の方法を用いて単離した。ポリ(A)* RNAを前記全RNAから3サイクルのオリゴdTセルロースクロマトグラフィー (Aviv及びLeder, 1972)により選択した。

2 µgのポリ(A)* RNAを、IX Superscript™ 反応緩衝液、10mMジチオスレイトール、500 µM dATP、500 µM dGTP、500 µM dTTP、500 µM 5-メチル-dCTP、0.75 µgオリゴヌクレオチド#8及び2 µL Superscript™ 逆転写酵素 (BRL)を含む20 µL体積中で逆転写した。反応混合物を37℃にて50分間、44℃にて10分間インキュベートし、次に氷上に置いた。

第二順反応混合物 (140 µL)を第一順反応混合物に加えた。第二順反応混合物は21mM Tris-HCl、104mM KCl、5.3mM MgCl₂、171 µM β-NAD、11.4mM(NH₄)₂SO₄、214 µM dATP、642 µM dCTP、214 µM dGTP、214 µM dTTP、4 mM DTT、10 µCi³²P-dCTP(3000 Ci/m mole)、15ユニット大腸菌DNAリガーゼ、40ユニットDNAポリメラーゼ (Boehringer) 及び0.8ユニットRNase Hから成った。最終混合物を16℃にて150分間インキュベートした。2本鎖cDNAを平滑末端化するため、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、そして反応を16℃にてさらに15分間続けた。反応を停止し、cDNAをフェノール/クロロホルム抽出、そして次にクロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製した。

EcoRIアダプター (Promega)をcDNAに連結し、そして次に製造者により推奨された条件を用いてキナーゼ処理した。加熱 (70℃、20分)により酵素を変性させ、そしてフェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によりDNAを抽出した。cDNAを50ユニットのXhoI

(Boehringer)により、100mLの反応体積中で、製造者の推奨する条件を用いて消化した。酵素を加熱失活させ (70℃、20分間)、そして混合物を、STE 緩衝液 (Sambrookら、1989) 中で平衡化されたS400スパンカラム (Pharmacia)に通した。溶出液をフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿させた。4℃にて30分間のマイクロ遠心分離の後、cDNAペレットを70% (v/v)エタノールで洗浄し、空気乾燥し、そして10 µLのTE緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA) 中に再懸濁した。

そのうち、7.5 µLを1% (w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動し、1.3~2.5 Kbのサイズ範囲のcDNAを単離するためにNA-45膜 (Schleicher及びSchuell)を用いた。

サイズ分画されたcDNAを、50mM Tris-HCl(pH7.0)、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1 mM ATP及び2 ユニットのT4 DNAリガーゼから成る反応緩衝液 5 µL中で、λ ZAP II EcoRI/XhoI/CIAP処理ベクター (Stratagene) 1 µgと連結した。反応は4℃にて2日間行った。

室温に2時間置いた後、Packagene系 (Promega)を用いて連結反応混合物をパッケージした。組換え体の全数は270,000pfuであった。

150,000pfuの量のパッケージされたcDNAを、PLK-F'細胞のトランスフェクションの後、15cm直径のプレート当り10,000pfuでプレートした。プレートを37℃にて8時間インキュベートし、そして4℃にて一夜貯蔵した。2枚のリフトをColony/Plaque Screen™ フィルター (Dupont) 上に取り、そして製造者が推奨するように処理した。

オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドを、Applied Biosystems PCR-Mate DNA合成機上で、製造者により推奨される方法を用いて合成した。合成され

たオリゴヌクレオチドは5' - 3' の方向に次の通りであった。

オリゴ1: GGAAGCTTATCCTT(C/T)GGGCGG

オリゴ2: GGATGACTCAGTAAACGACGGCCAGT

オリゴ3: CCIGG(A/G)CAIATC(G/T)(C/T)TICGICCC(A/G)

AAIGG

オリゴ4: GGATGACTCAACAGCTATGACCATG

オリゴ5: GTTCAATTCGGAATGATG

オリゴ6: GCTGCACTTAATCCATAT

オリゴ7: TGCATAGCTTTTGGG

オリゴ8: GAGAGAGAGAGAGAGAGATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTT

オリゴ9: ATGCTCTCTCCAGTG

オリゴ10: CTAGACTCCAATCAC

オリゴ2及び4は、2本鎖PCR生成物の濃縮を促進することが示されている (Lem及びKemp, 1989) GCN4結合部位 (アンダーラインで示してある)を含んだ。

オリゴ3の設計のための基礎は次の通りであった。アボカドのシトクロムP450の想定されるヘム結合ドメインからのアミノ酸配列 (Bozakら、1990) 及び2つのベチュニアシトクロムP450相同 pCGP142及びpCGP147によりコードされる対応する配列を並列させた。

アボカド	P	F	G	A	G	R	R	G	C	P	G
pCGP142	P	F	G	A	G	K	R	I	C	P	G
pCGP147	P	F	G	S	G	R	R	I	C	P	G

3つの植物シトクロムP450のヘム結合領域のコンセンサスアミノ酸配列は次の様に見ることができよう。

P	F	G	A	(S)	G	R	(K)	R	I	(G)	C	P	G
---	---	---	---	-----	---	---	-----	---	---	-----	---	---	---

3種のシトクロムP450分子のヘム結合ドメイン中に見出されるアミノ酸をコードすることができるヌクレオチド配列の可能な順列は

次の様に演えきすることができよう。

5'	-	CCX	TTT	GGX	GCX	GCX	AGX	CGX	ATX	TGT	CCX	GGX	-	3'
							C	AG		CA	A	GG		C
										T				

Xは4種類すべてのヌクレオチド (A, C, G及びT)を使用することができるヌクレオチド位置を示す。オリゴ3は、3種の植物シトクロムP450に由来するコンセンサス配列のサブセットを相補するように設計された。塩基の縮重が3より大である場合、デオキシイノシン (I)を用いた。得られるオリゴヌクレオチド配列は上に示す通りであった。

PCR 反応

ヘルパーファージR408 (Stratagene)を用いて、製造者により記載された方法を用いて、200,000pfuの増幅されたλ ZAP cDNAライブラリー#1からベチュニアcDNA挿入部を含有するpBluescript ファージミドを切り出した。大腸菌XL1-Blueをファージミド混合物によりトランスフェクトし、そして250,000コロニーをアンピシリン含有培地上にプレートした。細胞をLB (Sambrookら、1989)に再懸濁し、そしてアルカリ溶解法 (Sambrookら、1989)を用いてプラスミドDNAを単離した。CsClグラジエント上でのバンド形成によりプラスミドDNAをさらに精製した。このDNAをPCR用鋳型として用いた。

花卉シトクロムP450同族体の増幅のためのPCR反応混合物は5 ngから100ngの切り出されたDNA、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01% (w/v)ゼラチン、0.2 mMずつのdNTP、0.4 µMずつのプライマー及び1.25ユニットのTaqポリメラーゼ (Cetus)を含有した。反応混合物 (50 µL)を、94℃、48℃及び72℃の間で各温度において1分間ずつ、30回循環した。増幅された生成物をGeneclean (Bio 101 Inc.)を用いてゲル精製し、クローニングの

ために十分な量を得るために再増幅し、そして次にT4 DNAポリメラーゼを用いて末端修復した。オリゴ1及び2を用いて増幅したDNAをHindIII及びXhoIで消化した後にpBluescriptにクローニングした。オリゴ3及び4間の増幅により生じたPCT生成物を、Holton及びGraham (1991)により記載されたddT-テイルpBluescriptに直接クローニングした。

cDNAライブラリーのスクリーニング

2枚のブラークリフトを次のようにしてハイブリダイズさせそして洗浄した。高ストリンジエンシー条件（ハイブリダイゼーション：50% (v/v)ホルムアミド、6xSSC、1% (w/v)SDS、42℃にて16時間、及び洗浄：2xSSC、1% (w/v)SDS、65℃にて2×15分間、これに続き0.2xSSC、1% (w/v)SDS、65℃にて2×15分間）を用いて兄弟クローンを検出し、そして低ストリンジエンシー条件（ハイブリダイゼーション：20% (v/v)ホルムアミド、6xSSC、1% (w/v)SDS、42℃にて16時間、及び洗浄：6xSSC、1% (w/v)SDS、65℃にて1時間）を用いて関連配列を検出した。

ノザン分析

全RNAを、液体N₂中で凍結した組織から単離し、そして乳鉢と乳を用いて微粉砕した。4Mイソチオシアネートグアニジン、50mM Tris-HCl (pH8.0)、20mM EDTA、0.1% (v/v)Sarkosylの抽出緩衝液を組織に添加し、そして混合物を最大速度でポリトロンを用いて1分間ホモジナイズした。懸濁液をMiracloth (Calbiochem)を用いて濾過し、そしてJA20ローター中で10,000rpmにて10分間遠心した。上清を集め、そして0.2g/mL CsCl (w/v)にした。次に、サンプルを、38.5mLのQuick-seal遠心チューブ (Beckman)中で5.7M CsCl、50mM EDTA (pH7.0)の10mLクッション上に重層し、そしてTi-70ローター中で、42,000rpmにて12〜16時間23℃において遠心した。ベレ

して0.7% (w/v)アガロースゲルを通して、TAE (40mM Tris-アセテート、50mM EDTA)の泳動緩衝液中で電気泳動した。次に、DNAを変性溶液 (1.5M NaCl/0.5M NaOH)中で1〜1.5時間変性させ、0.5M Tris-HCl (pH7.5) / 1.5M NaCl中で2〜3時間中和し、そして次にDNAをHybond N (Amersham)フィルターに20xSSC中で移行させた。

c. chi-Aプローブの単離

chi-A (van Tunen ら、1988)のcDNAクローンを、PCRにより、OGBの段階3の花弁RNAから作られたcDNA鋳型及び2つのオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち公表されたchi-A cDNA配列 (van Tunen ら、1988)のヌクレオチド6〜20をカバーする#9、及びヌクレオチド711-725に対して相補的な#10を用いて合成した。生ずるPCR生成物をpBluescribe M13⁺ (Stratagene)のSmaI部位に連絡し、そして配列決定して、クローン化された断片が公表された配列に対応することを確認した。

DNA プローブの³²P-ラベル化

DNA断片 (50〜100ng)を50μCiの (α-³²P)-dCTPにより、オリゴラベル化キット (Bresatec)を用いて放射能ラベルした。取り込まれなかった (α-³²P)-dCTPはSephadex G-50 (Fine) カラムのクロマトグラフィーにより除去した。

DNA 配列分析

Sangerら (1977)の方法と実質上同様にして、Sequenase 酵素 (USB、バージョン2.1)を用いてDNA配列決定を行った。クローンpCGP602、pCGP176及びpCGP175の完全な配列を、標準的クローニング方法 (Sambrookら、1989)を用いて得られた異なるM13-mp18及びmp19 (Norrander ら、1983; Yanish-Perron, 1985) サブクローンからの配列の編集により決定した。幾つかの領域については、オーバーラップする配列データを得るために特定のオリゴヌクレオチ

ットをTE/SDS (10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.1% (w/v) SDS)中に再懸濁し、そして10mM EDTA (pH7.5)中で飽和されたフェノール/クロロホルム/イソamilアルコール (25:24:1)により抽出した。エタノール沈殿の後、RNAベレットをTE/SDS中に再懸濁した。

RNAサンプルを、2.2Mホルムアルデヒド/1.2% (w/v)アガロースゲルにより、40mMモルホリノプロパンスルホン酸 (pH7.0)、5mM酸ナトリウム、0.1mM EDTA (pH8.0)を含有する泳動緩衝液を用いて電気泳動した。RNAを、製造者が記載するようにしてHybond-Nフィルター (Amersham)に移行させ、そして³²P-ラベル化cDNA断片 (10⁴cpm/μg, 2×10⁴cpm/mL)によりプローブした。プレハイブリダイゼーション (42℃にて1時間)及びハイブリダイゼーション (42℃にて16時間)を50% (v/v)ホルムアミド、1M NaCl、1% (w/v)SDS、10% (w/v)硫酸デキストラン中で行った。ハイブリダイゼーションの段階で、変性したサケ精子DNA (100μg/mL)を³²P-ラベル化プローブと共に加えた。

フィルターを2xSSC / 1% (v/v)SDS中で65℃にて1〜2時間洗浄し、そして次に0.2xSSC / 1% (v/v)SDS中で65℃にて0.5〜1時間洗浄した。フィルターを、増感スクリーンを用いて-70℃にて48時間コダックXARフィルムに感光した。

RFLP分析

a. ゲノムDNAの準備

DellaPortaら (1983)が記載したのと実質的に同様にして、葉組織からDNAを単離した。DNA調製物をCsCl浮力密度遠心 (Sambrookら、1989)によりさらに精製した。

b. サザンブロット

ゲノムDNA (10μg)を60ユニットのXbaIにより16時間消化し、そ

ドプライマーを合成する必要があった。この目的のために、次の6種のプライマーを合成した。

5' CGTGCCAATGAGCTAGG	3' プライマー配列1
5' GATGTTGGTTGACTGAG	3' プライマー配列2
5' GGAACCCAGATTTTCTTG	3' プライマー配列3
5' TTTTTTTTTTTTTTTT(AGC)	3' プライマー配列4
5' GTTTTCCCAGTCACGAC	3' プライマー-40'
5' AACAGCTATGACCATG	3' 逆プライマー

これらの配列の幾つかの位置を示すpCGP602の制限地図は図8に見られる。

Genbank SWISS-PROT及びEMBLデータベースに対する相同性の検索を、FASTA及びFASTAプログラム (Pearson及びLipman, 1988)を用いて実施した。

pCGP293の作製

発現バイナリー (binary) ベクターpCGP293は、TiバイナリーベクターpCGN1559 (McBride及びSummerfelt, 1990)から誘導された。プラスミドpCGN1559をKpnIで消化し、そして突出する3'-末端を標準的方法 (Sambrookら、1989)に行ってT4DNAポリメラーゼにより除去した。次に、ベクターをXbaIによりさらに消化し、そして生ずる5'突出部をDNAポリメラーゼIのKlenow断片を用いて修復した。次に、ベクターを再連絡してpCGP67を得た。Macプロモーター、ノスターミネーター及び種々のクローニング部位を有する1.97Kb PstI断片 (Comai ら、1990)をpCGP40から単離し、そしてpCGP67のPst部位に挿入してpCGP293を得た。

pCGN7334からGUS遺伝子 (Jefferson ら、1987)をBamHI-SacI断片として取り出し、そしてそれを、多クローニング部位を含むpBluescribe M13⁺からのBamHI-SacI断片で置き換えることにより

プラスミドpCGP40を作製した。Mac-GUS-mas 遺伝子融合体を含有する断片をpCGN7329 (Comai ら、1990) のXhoI部位に挿入することにより、プラスミドpCGN7334 (Calgene, Inc. (CA), 米国) を作製した。

pCGP90の作製

pCGP602 からのcDNA挿入部をpCGP293 のMac プロモーター (Comai ら、1990) の後にセンス方向にクローニングすることによりプラスミドpCGP90を作製した。cDNA挿入部を含有するBamHI-KpnI断片をpCGP602 から単離し、そしてpCGP293 のBamHI-KpnI消化物と連結した。pCGP90中の挿入部の正しい挿入を、ゲンタマイシン耐性形質転換体から単離したDNA の制限酵素分析により達成した。

酵母発現ベクターpYGA22mの作製

M13-mp18をEcoRI及びBgl IIにより消化して、マルチクローニング部位を含む700bp断片を生成させた。この断片をpYGA2269 (Ashikari ら、1989) からの9 Kb EcoRI-Bgl II断片と連結した。pYGA22m と称する得られた構成は、酵母グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼプロモーターの下流に挿入されたマルチクローニング部位を含んでいた (図11)。

pCGP618の作製

pCGP175 からの全部のcDNA挿入部を含有する1.8Kb EcoRI-KpnI断片をpYGA22m からの9 Kb EcoRI-KpnI断片と連結した。生ずるプラスミドpCGP618 は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結されたpCGP175 cDNA断片を含んでいた (図11)。

pCGP620の作製

pCGP176 からの完全なcDNA挿入部を含有する1.8Kb のEcoRI-KpnI断片を、pYGA22m(pCGP618 の作製について記載したように) からの

9 KbのEcoRI-KpnI断片と連結した。得られるプラスミドpCGP620 は、酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結されたpCGP176 cDNA断片を含んでいた。

酵母の形質転換

酵母G-1315株 (Mat α , *trp* 1) (Ashikari ら、1989) をIto ら (1983) に従って、pCGP618 及びpCGP620 により形質転換した。形質転換体を、G-1315をトリプトファン自律合成性 (prototrophy) に回復させるそれらの能力により選択した。

3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのための酵母抽出物の調製

a. G-1315/pCGP618

トリプトファンを欠く培地上に増殖したG-1315/pCGP618 及びG-1315復帰変異株の単一単離体を用いて50mLのYNBC (アミノ酸不含酵母ナイトロジェンベース (Difco) 1.2% (w/v), 2% (w/v) グルコース及び0.3% (w/v) カザミノ酸 (Difco)) に接種し、そして30℃にて2日間振とうしながらインキュベートした。細胞を遠心によりペレット化し、そしてミクロソーム成分をOeda ら (1985) に従って得たが、但し植物組織中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのために使用される抽出緩衝液中でスフェロプラストを破壊した。ミクロソーム ペレットを400 μ Lの緩衝液A (10mM Tris-HCl (pH7.5), 0.65Mソルビトール, 0.1mM DTT, 0.1mM EDTA) 中に懸濁し、そして100 μ Lのサンプルを3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

b. G1315/pCGP620

G-1315/pCGP620 の単一単離体を用いて20mLのYNBCに接種し、次にこれを2日間30℃にてインキュベートした。細胞を遠心分離により集め、TEにより1回及び緩衝液Aにより1回洗浄し、そして次

にザイモリアーゼ100 T (0.1mg/mL) (生化学工業) を含有する緩衝液B (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1.2Mソルビトール, 0.1mM DTT, 0.1mM EDTA) 中に再懸濁した。30℃にて1時間のインキュベーションの後、細胞を遠心分離によりペレット化し、そして400 μ Lの緩衝液A中に再懸濁した。次に、細胞懸濁液をガラスビーズ (直径0.4mm) と共に2分間ボルテックスし、そして100 μ Lのサンプルを3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

ベチュニアの形質転換

a. 植物材料

ベチュニア・ハイブリダ (Skr4 x Sw63, 及びRp57 x Rw14) の種子を1.25% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム中で10分間殺菌し、そして無菌水中で3回洗浄した。殺菌された種子を100mg/L のジベレリン酸 (GA₃) 溶液に16~20時間浸漬した。次に、これらを、1% (v/v) シュクロース及び0.8% (w/v) ディフコ (Difco) バクテリアアガーを補充した10% (w/v) MS (Murashige 及び Skooy, 1962) 上で2週間発芽させた。

若い実生を、3% (w/v) シュクロースが補充されたMS培地に3週間移し、次にジフィー・ピート (Jiffy peat) ペレット (Jiffy Products Ltd. ノルウェイ) に移し、高湿度のもとに保持し、そして2~3週間光照射した (135 μ E, 塩化水銀灯22℃)。次に、これらの若植物を育成キャビネット (68 μ E, 冷白色蛍光灯, 25℃)。同時培養 (co-cultivation) のため、若い実生を収穫し、そして1.35% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム中で2分間殺菌し、次に無菌水中で3回洗浄した。次に葉組織を25mm² の正方形に切断し、そして0.05mg/Lのカイネチン及び1.0mg/Lの2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) を補充したMS培地上で24時間前培養した。

b. アグロバクテリウムとベチュニア組織との共存培養

バイナリーベクターpCGP90 (図14) を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス AGLO (Lazo ら、1991) を4℃にて、100mg/L のゲンタマイシンを含有するMG/L (Garfinkel 及びNester, 1980) 寒天プレート上に保持した。1% (w/v) バクト・ベプトン、0.5% (w/v) バクト酵母エキス及び1% (w/v) NaCl を含有する液体培地中で単一コロニーを一夜増殖させた。次の日、3% (w/v) シュクロースを含有する液体MS培地 (BPM) 中への希釈により5 $\times 10^8$ 細胞/mLの最終濃度を調製した。葉のディスクを、AGLO/pCGP90を含有するBPM中に浸漬した。次に葉のディスクを紙の上で乾燥し、そして共存培養培地上に4日間置いた。共存培養培地は、0.05mg/Lのカイネチン及び1.0mg/Lの2, 4-Dが補充されたSH (Schenk 及びHildebrandt, 1972) から成り、そして共存培養培地に一面に並べられたタバコ細胞懸濁物のフィーダー層及びそのタバコ細胞懸濁物の上に置かれた濾紙を含んでいた。

c. トランスジェニックベチュニア植物の再生

共存培養の後、葉組織を次の選択培地に移した: Skr4 x Sw63 のディスクは、3% (w/v) シュクロース、2mg/Lの α -ベンジルアミノプリン (BAP), 100mg/Lカナマイシン、350mg/Lセフトキシム (cefotaxime) 及び0.3% (w/v) ゼライト・ゼラン・ガム (Gelrite Gellan Gum) (スイス) を補充された新鮮なMS培地へ; Rp57 x Rw14 のディスクは、2mg/LのBAPの代わりに0.5mg/LのBAP及び α -ナフタレン酢酸 (NAA) を含有する同じ培地に。3週間後、再生しつつある外植片を新鮮な培地に移した。カナマイシン選択に対して生き残った不定芽を、根の誘導のため、100mg/Lカナマイシン及び350mg/Lセフトキシムを含有するBPMに移した。すべての培養物を16時間照射 (60 μ E, 冷白色蛍光灯) のもとで23 \pm 2℃に

保持した。根が2~3 cmの長さに達した時、トランスジェニックベ
チュニア植物を、8 cmのチューブ中のオートクレーブ殺菌された
Deeco 51410/2 ポットミックスに移した。4週間後、植物を同じポ
ットミックスを用いる15 cmのポットに再移植し、そして14時間照射
(300 μ E、ハロゲン化水銀灯)のもとで23℃にて保持した。

タバコの形質転換

a. 植物材料

ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) (cv. Xanthi) スト
ック植物は、1 mg/Lのインドール酢酸 (IBA) が補充されそして
0.25% (w/v) ゲルライト (Gelrite) に上り固化されたMS培地に維
持した。葉の組織を25 cm²の正方形に切断し、そして1 mg/LのBAP 及
び0.5 mg/Lのインドール酢酸 (IAA) を含有するMS培地に24時間置い
た。

b. アグロバクテリウムとタバコ組織との共存培養

ベチュニアについて前記したようにして共存培養を行った。

c. トランスジェニックタバコ植物の再生

共存培養の後、葉のディスクを、1 mg/LのBAP、0.5 mg/LのIAA、
100 mg/Lのカナマイシン及び350 mg/Lのセフトキシムが補充され
たMS培地 (選択培地) に移した。2~3週間後、再生しつつある外
植片を新鮮な選択培地に移した。カナマイシン選択に対して生き残
った不定芽を単離し、そして根の誘導のため、1 mg/LのIBA、100
mg/Lのカナマイシン及び350 mg/Lのセフトキシムを含有するMS培
地に移した。根が2~3 cmの長さに達した時、ベチュニアについて
記載したようにして、トランスジェニックタバコ植物を土壌に移植
した。

カラム温度: 35℃

検出: 280, 350 及び546 nm での同時データ取得によるMWD
アントシアニジンのピークは既知標準との比較により同定した。

2. 3', 5'-ヒドロキシラーゼのクロニング及び分析

3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素の特性決定

a. 発生段階による制御 (Developmental Regulation)

前に定義した発達の異なる段階における花から収獲したP、ハイブ
リダ cv. OGBの花弁の抽出物を3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性に
ついて測定した。

OGBの花弁中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素活性は花冠の
成熟の間に発生段階による制御がされることが見出された (図2B)。
この発生的プロフィールはフラボノイド生合成に関与する他の遺伝
子の発現と平行した。3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素の活性、
並びにカルコン (chalcone) シンターゼ (CHS)、カルコンフラボ
ンイソメラーゼ (CHI) 及びジヒドロフラボノールレダクターゼ (DF
R) 遺伝子の発現は花の発達の段階3~4付近でピークとなった。

b. 葉組織における3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性の誘導

フラボノイド色素生合成経路の遺伝子は通常は葉組織中では発現
されない。しかしながら、デルフィニジン色素の合成はOGBの葉に
おいて、2% (w/v) グルコース溶液中強い光のもとでのインキュベ
ーションにより誘導された。これらの条件下で、3', 5'-ヒド
ロキシラーゼ酵素活性がOGB葉組織中で検出され得る。酵素活性の
最大誘導が96時間のグルコース/高光処理の後に起こることが示さ
れた。これらの条件下で、幾つかの他の色素生合成遺伝子の発現も、
発生中の花弁中に観察されるレベルに匹敵するレベルに誘導された。
これらの結果から、Hf1及び/又はHf2遺伝子がグルコース/高光
処理された葉組織において誘導されると結論された。

アントシアニジンの分析

HPLC分析に先立って、花弁抽出物中に存在するアントシアニン分
子を酸加水分解して、アントシアニン核からグリコシル成分を除
去した。アントシアニン色素のB環でのヒドロキシル化パターンを
アントシアニン核分子のHPLC分析により決定した。この分析にお
いて使用したHPLC系は多波長検出器 (MWD) を備えたHewlett Pack and
1050であった。Spherisorb S5 ODS2カートリッジカラム250 mm \times
4 mm ID上で逆相クロマトグラフ分離を行った。

a. アントシアニン及びフラボノイドの抽出

花の色素を、花弁の断片 (約50 mg) から、1% (v/v) の水性6M塩
酸を含有するメタノール5 mlにより抽出した。抽出物を水で希釈し
(1:9)、そして濾過した (Millex HV, 0.45 μ) 後にHPLC系に
注射した。

b. アントシアニンの加水分解

前記 a. において得た粗メタノール抽出物 (100 μ L) を室温に
て乾燥窒素流を用いてPierce Reacti-Vials 中で蒸発乾燥した。残
渣を200 μ Lの2M HCl に溶解し、バイアルにキャップを付し、そし
て次に100℃にて30分間加熱した。加水分解混合物を水 (1:9)
で希釈し、そしてHPLC分析に先立って濾過した (Millex HV, 0.45
 μ)。

c. クロマトグラフィー

花の色素の分離は、次の系を用いるグラジェント溶出により行っ
た。

溶剤 A: (トリエチルアミン: 濃硫酸: H₂O) (3:2.5:1000)

溶剤 B: アセトニトリル

グラジェント条件: 20分間にわたり5% Bから40% Bへ

流速: 1 ml/分

c. 3', 5'-ヒドロキシラーゼがシトクロムP450クラスの酵 素に属することの証明

OGB花弁中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性はミクロソーム
画分に関連しており、そしてNADPHの存在に依存することが示され
た。活性は、一酸化炭素によるミクロソームの処理により、及びシ
トクロムP450酵素を特異的に不活性化する2種類の阻害剤、テトラ
イクラシス (tetracycline) 及び1-アミノベンゾトリアジン (Taton
ら、1988; Matthewsら、1985; Rademacherら、1987)、により阻害
されることができた。

シトクロムP450配列について濃縮されたcDNAライブラリーの作製

シトクロムP450 mRNAの翻訳は膜結合ポリソームにおいて起こる
(Takemori及びKominami, 1989)。従って、シトクロムP450配列
(3', 5'-ヒドロキシラーゼ配列を含む) について濃縮するた
め、段階3~4の花のOGBの花弁から単離された膜結合ポリソーム
RNAを用いてcDNAライブラリーを作製した。段階3~4の花からの
花弁のRNAの単離により、3', 5'-ヒドロキシラーゼ配列がこ
のライブラリーにおいて最高に代表されることが保証された。なぜ
なら、3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は発生のこの段階におい
て最大であることが示されたからである (前記及び図2Bを参照のこ
と)。cDNAライブラリー-1と称する得られたライブラリーは250,000
の一次複製体を含んでいた。

ベチュニアの花弁シトクロムP450 cDNAのPCR増幅

多数のシトクロムP450が、脊椎動物、菌類、昆虫、細菌及び1種
の植物 (Nebertら、1991; Bozakら、1990) と、多様な生物体から
配列決定されている。これらすべての酵素の特徴は、特にヘム結合
に関与するシステイン残基付近での、多数の小さな配列保存領域の
存在である。今日までに配列決定されているほとんどすべてのミク

ロソーム由来シトクロムP450のヘム結合ドメインにアミノ酸配列 P(G.S)XGXRXCXGが存在し、ここでXはいずれのアミノ酸であってもよい(図3)。このコンセンサス配列をPASTA プログラム (Pearson 及び Lipman, 1988) を用いて NBRF 蛋白質データベースと比較することにより、データベース中のすべてのミクロソーム性シトクロムP450配列についてこの領域付近のアミノ酸の存在頻度を決定した。この分析が示すところによれば、ヘム結合ドメイン付近の各位置の最も共通なアミノ酸配列は:

FMPFGAGXRXCGLG

アンダーラインを付した配列及び類似の配列をコードする遺伝子にハイブリダイズするようにオリゴヌクレオチドを設計した。オリゴ1と称するこのオリゴヌクレオチドを下に示す。

5' - GGAAGCTTATTCCTT(T/C)GGGCTGG - 3'

アンダーラインを付した部分は、PCR 生成物の方向性クローニングを促進するための HindIII 認識部位を含む追加の配列である。デオキシイノシン (I) を含めることにより、2以上のコドンが同一のアミノ酸配列をコードし得るようなコドンの使用の異なる可能性がカバーされた。デオキシイノシンは類似の効率で A, T, G 及び C に塩基対合する (Martinら, 1985; Ohtsuka ら, 1985)。

「材料及び方法」の項に記載したようにして cDNA ライブラリー #1 から得られたプラスミド DNA を、オリゴ1及び2を用いての360bpのシトクロムP450関連配列の増幅のための鋳型として使用した(図3)。オリゴ2は-20プライマー (Stratagene) の5'-末端に GCN4結合部位 (Lew 及び Kemp, 1989) を付加したものに対応する。PCR 断片を pBluescript にクローニングし、そして生ずるプラスミドを pCGP450 と称した。pCGP450 の5'-領域はすでに配列決定されているシトクロムP450分子に対して有意に相同性を有するポリペ

プチド配列をコードする。

ベチュニアの花弁cDNAライブラリーからのシトクロムP450同族体の単離

プラスミド pCGP450 を用いて、関連クローンについて cDNA ライブラリー #1 (60,000 プラーク) をスクリーニングした。高ストリンジエンシー及び低ストリンジエンシーの条件下での2つの引続くハイブリダイゼーションを用いて、pCGP450 の兄弟クローン及びシトクロムP450cDNAの第二グループの両者を検出した。兄弟群のそれぞれの代表的cDNAクローンを次の段階の分析のために選択した。pCGP450の兄弟クローンを pCGP142 と命名し、そして第二グループの代表を pCGP147 と命名した。次に、pCGP147 のコード配列のみを含む SaII-EcoRI断片を用いて cDNA ライブラリー #1 からの16,000 プラークを低ストリンジエンシーにおいて再プローブした。このプローブとハイブリダイズする合計20クローンを配列決定し、さらに2つのシトクロムP450同族体 pCGP158 及び pCGP160 を同定することができた(図4A)。

追加の花弁シトクロムP450同族体のPCRによる単離

ベチュニアのクローン pCGP142 及び pCGP147 並びにすでに配列決定されているアボカドのシトクロムP450配列 (O'Keefe 及び Leto, 1989; Zozak ら, 1990) の推定上のヘム結合ドメイン付近からの配列情報を「材料及び方法」の項に記載したのと同様にして用いて、前記3つのシトクロムP450クローンの少なくとも2つによりコードされるアミノ酸配列をカバーする第二の縮重オリゴヌクレオチド (オリゴ3) を設計した。このオリゴヌクレオチドを用い、そして鋳型としての cDNA ライブラリー #1 及び第二プライマーとしてのオリゴ4を用いて、PCR により関連配列を増幅した(図3B)。サイズ範囲250 ~ 500bp の反応生成物を「材料及び方法」の項に記載したよ

うにして単離し、そして Holton 及び Graham (1991) により記載された ddT を付加した pBluescript ベクターにクローン化した。クローン化された PCR 断片を配列決定し、第五のシトクロムP450同族体をコードすることが示された。pCGP454 と称する1つのクローンを更なる分析のために選択した。

cDNAライブラリー #1からの更なるシトクロムP450同族体の単離

シトクロムP450同族体 pCGP142, pCGP147, pCGP158 及び pCGP160 のコード領域並びに pCGP454 からの cDNA (図4B~4H) を含む ³²P-ラベル化 DNA 断片の混合プローブを用いて、関連配列のために、cDNA ライブラリー #1 から50,000個のクローンをスクリーニングした。低ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で合計152個のハイブリダイズするクローンが検出された。ハイブリダイズするクローンから単離された DNA の配列分析により更なる13の異なるシトクロムP450同族体が同定された。これらのクローン間で2つの密接に関連する兄弟群が区別された。これら2群のそれぞれのコード領域は DNA レベルで94%の相同性又は類似性を示した。1つの兄弟群の2つの代表 pCGP174(図5A) 及び pCGP176, 並びに他の兄弟群の1つの代表 pCGP175 (図5B) を更なる研究のために選択した。

シトクロムP450同族体のナサン及びRFLP分析

3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする cDNA の分子的特徴を有するシトクロムP450同族体区別するためにノザン及びRFLP分析を用いた。P₂ ハイブリダ中には3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を制御する2つの遺伝子座 Hf1 及び Hf2 が存在する (de Vlammingら, 1984; Wiering, 1974)。Hf1 は P₂ ハイブリダの花の周 及び管の両方において発現され、そして周縁のみで発現される Hf2 に比べて非常に高いレベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性をもたらす。ベチュニアの3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性も発生的且つ空間

的に制御される。通常の成育条件のもとで、この酵素は花弁組織においてのみ検出することができ、花の発達段階の段階3~4付近で最高レベルに増加しそして十分に開いた花において低下する(段階5: 図2(B)を参照のこと)。活性はまた、ある種のストレス条件、例えば前記のグルコース/高光処理のもとで葉組織においても誘導され得る。従って、3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする cDNA クローンは、酵素活性プロファイルと平行する RNA プロット上の発現プロファイルを有すると予想された。さらに、P₂ ハイブリダの3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする cDNA はクローンは Hf1 又は Hf2 のいずれかに位置すると予想された。Hf1 は P₂ ハイブリダのゲノムの染色体 I にマップされており、そして Ph1 遺伝子座に連鎖している (Cornu, 1984; Cornuら1990) が、Hf2 は染色体 V 上の Po に密接に連鎖している (Wallrothら, 1986)。純系 V23(Hf1/Hf1, Hf2/Hf2) と R51(hf1/hf1, hf2/hf2) との交配に由来する植物の F₂ 代から単離された DNA の RFLP 分析を用いて、種々のシトクロムP450同族体についての連鎖データを得た。Hf1 / - 遺伝子型は花の管に3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有する F₂ 植物に帰属された。さらに、花弁の液胞の pH に影響を与える ph 遺伝子への連鎖に基づいて、Hf1 / Hf1 遺伝子型を F₂ 集団の植物に帰属させることが可能であった (Wiering 及び de Vlamming, 1984)。

V23 親系 (Hf1 / Hf1) はまた約6.2の花弁ホネジネート pH をもたらす ph1 / ph1 遺伝子型を有していた。ph1 / - 植物は5.3の花弁ホネジネート pH を有するので、花弁ホネジネートの pH を測定することにより R51 x V23 F₂ 集団内の ph1 / ph1 (Hf1 / Hf1) 植物を区別することが可能であった。

Hf2 及び Po 遺伝子座間の連鎖を用いて、候補 Hf2 クローンを区別

した。Po座は、酵素カルコンフラボノインソメラーゼをコードするP₂ハイブリダチA遺伝子に対応することが示されている(van Tunen ら, 1991)。従って、chiAのcDNAクローンは、P₂集団中の個体にPo又はPo遺伝子型を帰属させるためのRFLP分析において使用することができた。V23はHf2/Hf2、Po/Po遺伝子型を有するので、chiAプローブにより検出されるV23様及びR51様RFLPパターンとPo及びPoパターンとの同時分離(co-segregation)によりHf2遺伝子座への連鎖を決定することができた。

シトクロムP450同族体の3'-非翻訳領域に対応するcDNA断片を使用して、V23 x R51F₂集団中の個々の植物から単離されたゲノムDNAのサザンブロット及びRNAブロットをプローブした。この分析により、cDNAクローンpCGP174及びpCGP175に対応する遺伝子が3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性に平行する態様で発現されたことが示された。さらに、pCGP174に対応する遺伝子はHf1遺伝子座に密接に関連しており、そしてpCGP175はHf2遺伝子座に関連していることが示された。

a. pCGP174

クローンpCGP174(図5A)からの330bpのHindIII-KpnI 3'-断片はRNA及びDNAの両ブロット上のハイブリダイゼーションのパターンを与え、このパターンはこのクローンがHf1遺伝子座に対応することを示した(図6)。この遺伝子は周縁組織及び管組織の両方で発現され、そして3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性と平行する発現プロファイルを有し、段階3の花弁周縁にピークを示した。葉においては発現は観察されなかったが、この組織においてグルコース/高光処理により誘導された。さらに、Hf1/Hf1変異系R51及びSw63の花弁組織中に遺伝子の検出可能な発現は存在しなかった。これに対して、Hf1/Hf1系V23及びTh7並びにV23 x R51雑種にお

いては高レベルの発現が観察された(図6A)。

XbaIにより消化されたゲノムDNAのサザンブロットにおいて、pCGP174からの330bpのHindIII-KpnI 3'-断片は、V23 x R51 P₂集団において独立に分離する(segregate)2つのRFLPを検出した。RFLP#1は強くハイブリダイズするDNAバンドに対応し、他方RFLP#2は弱くハイブリダイズするバンドに対応した(図6Bを参照のこと)。ph1/ph1遺伝子型に帰属された12の植物の11がRFLP#1についてV23様パターンを有し、そして管において3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有する49の植物の内49がRFLP#1についてV23又はVR様パターンのいずれかを有していた。さらに、全32の植物について、chiA(Po)についてのV23, VR及びR51 RFLPパターンとRFLP#2の対応するパターンとの完全な同時分離(co-segregation)が存在した。

これらのデータは、pCGP174が3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしておりそしてHf1遺伝子座(RFLP#1)に対応すること、及び3'-プローブがHf2遺伝子座(RFLP#2)にクロスハイブリダイズすることの強力な証拠を提供した。

b. pCGP175

クローンpCGP175(図5B)からの320bpのHindIII-XhoI 3'-断片はRNA及びDNAブロットの両者上のハイブリダイゼーションのパターンを与え、このパターンはこのクローンがHf2遺伝子座に対応することを示唆した(図7)。ノザン分析が示すところによれば、この遺伝子はpCGP174と同様に発生的に制御され、段階3のOGB花弁周縁において最大の発現を示すが、OGBの管組織においては発現は観察されなかった。この遺伝子はまた、V23(Hf2/Hf2), Th7(Hf2/Hf2)、及びV23 x R51雑種の花弁組織中でも発現された(図7A)。

サザンブロットにおいて、pCGP175からの320bp HindIII/XhoI断

片は、pCGP174の3'側プローブ(RFLP#2)に弱くハイブリダイズするV23及びR51ゲノムDNAのXbaI消化により生成した同じゲノム断片にハイブリダイズした。pCGP175の3'側プローブにより検出されるV23, VR及びR51様RFLPパターン並びにchiA(Po)についての対応するRFLPパターンの完全な同時分離(co-segregation)が存在した。

次に発現実験(下記参照のこと)は、pCGP175及びpCGP174の兄弟(pCGP176)の両者が3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしていることを確認した。さらに、Hf1/Hf1, Hf2/Hf2ベチューニアの変異株におけるpCGP174の完全長バージョンの発現は増加した3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性、及び非-トランスジェニック植物において通常見出される低い基座レベルを上回る3', 5'-ヒドロキシル化アントシアンの生産をもたらした。RFLPの結果と相まって、これらのデータから、pCGP174がHf1遺伝子座に対応し、そしてpCGP175がHf2遺伝子座に対応することが結論された。

完全長Hf1 cDNAクローンの単離及び配列分析

予備的配列分析から、pCGP174は対応する転写物の完全長クローンを代表せず、pCGP175が推定上の開始コドンを含み、そして完全長cDNAであると推定された。配列分析はさらに、pCGP176はpCGP174の一層長いバージョンであって、5'-末端から176bpにATGコドンを含むことを示した。しかしながら、この分析のみからは、pCGP176がこの遺伝子の全コード領域を含むか否かを確信して予想することは不可能であった。行って、pCGP174/pCGP176兄弟群の一層長いクローンについて、cDNAライブラリー#2をスクリーニングした。cDNAライブラリー#2からの約1.5 x 10⁴個の組換え体、pCGP174からの0.33Kb HindIII-KpnI 3'-断片にハイブリダイズするクローンについてスクリーニングした。pCGP601及びpCGP602

と称するハイブリダイズするクローンを、更なる分析のために選択した。pCGP601及びpCGP602の両者は推定上の翻訳開始コドンを含んでいたが、pCGP602はより長い5'-非翻訳領域を含んでいた。

クローンの配列決定のために適合された方法及びオーバーラップする配列情報を得るために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー配列を示すpCGP602の制限酵素地図を図8に示す。

兄弟株pCGP176及びpCGP602のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を図9に示す。同様に、図10はpCGP175のヌクレオチド配列及び推定される翻訳生成物を示す。

LFASTAプログラム(Pearson及びLipman, 1988)により生ずる整列を用いて、ベチューニアの3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子によりコードされるアミノ酸配列は94%の位置的同一性を共有することが見出された。ヌクレオチド配列は94%同一であった。シトクロムP450の分類方式に基づいて、この配列の類似性は両遺伝子と同じファミリー/サブファミリーに置いた。3', 5'-ヒドロキシラーゼのアミノ酸配列はシトクロムP450スーパーファミリーのすでに特性決定された構成員のいずれとも40%未満の同一性を共有するので、対応する遺伝子は、他のすべてのP450遺伝子とは別の新しいP450ファミリーに属する。

酵母におけるpCGP175 cDNAの発現

pCGP175からのcDNA挿入部を酵母ベクターpYGA22m中のグリセアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結した。pCGP618(図11)と称する得られた構成物を酵母G-1315株(Ashikariら, 1989)に形質転換した。単一形質転換体を50mLのYNBC中で30℃にて2日間増殖させた。この培養物から調製したミクロソーム画分は3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有することが示されたが、非形質転換酵母から調製された同等の画分は

活性を有しなかった(図12)。このことから、pCGP175からのcDNA挿入部は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしていると結論された。

酵母におけるpCGP176 cDNAの発現

pCGP176からのcDNA挿入部を酵母ベクターpYGA22m中のグリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結した。pCGP620と称する得られた構成物を酵母G-1315株に形質転換した。形質転換された酵母から調製された抽出物は3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有するが、非形質転換酵母から調製された同等の画分は活性を有しないことが示された(図13)。このことから、pCGP176からのcDNA挿入部は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしていることが結論された。

Hf1 cDNAの発現

a. hf1/hf1, hf2/hf2 P. ハイブリッドP₁雑種Skr4 x Sw63における発現

pCGP602のcDNA挿入部をTi-バイナリーベクターpCGP293のMacプロモーターの後に連結した。pCGP90(図14)と称する得られた構成物を、アグロバクテリウム介在遺伝子移送を用いてF₁ベチューニア雑種Skrx x Sw63に導入した。Skr4 x Sw63の葉ディスクをAGL0/pCGP90と共に同時培養し、そしてSkr4 x Sw63ゲノムへのpCGP602 cDNA挿入部の組み込みを、カナマイシン選択後に得られた植物のサザン分析により確認した。

トランスジェニック植物は、非トランスジェニックSkr4 x Sw63雑種よりも有意に高いレベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素活性(図15)及び3', 5'-ヒドロキシル化アントシアニン(表3A)の両方を有していた。Skr4 x Sw63はHf1遺伝子及びHf2遺伝子の両方についてホモ接合性劣性であるが、低レベルの3', 5'

-ヒドロキシラーゼ活性がSkr4 x Sw63の花弁抽出物において検出されるので(図15)、これらの変異は酵素生産を完全にはブロックしない。さらに、酸加水分解されたSkr4 x Sw63の花弁抽出物において低レベル(100 µg/gm)のマルビジン(malvisin)が検出された(表3A)。Hf1 cDNAの導入が花弁組織中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のレベルを増加させ(図15)、そしてトランスジェニック植物からの花弁の酸加水分解された抽出物は、非トランスジェニック対照において検出されたマルビジンの4倍のレベルを有していた。

b. ニコチアナ・タバクム・カルチパー・キサンシ(*Nicotiana tabacum* cultiva Xanthi)での発現

タバコ(N. *tabacum* cv Xanthi)の花は、唯一のアントシアニンとしてシアニジンを生産する。pCGP90によるタバコの形質転換は、シアニジンに加えて有意量のデルフィニジンの蓄積を導いた(表3A)。

表3A
色素分析

Anthocyanidin levels found in acid hydrolysed petal extracts
加水分解された花弁抽出物に見出されるアントシアニジンのレベル

植 物	マルビジン (µg/gm花弁)	シアニジン (µg/gm花弁)	デルフィニジン (µg/gm花弁)
ベチューニア			
Skr4 x Sw63	100	nd ¹	nd
Skr4 x Sw63/pCGP90	410	nd	nd
タバコ			
非同時培養対照	nd	272	nd
Transgenic tobacco	nd	229	36
トランスジェニックタバコ			

検出されず。

c. hf1/hf1, hf2/hf2 P. ハイブリッドP₁雑種Rp57 x Rwl4における発現

pCGP90, 及びSkr4 x Sw63について使用したのに類似する方法を用いて、ベチューニアRp57 x Rwl4系を形質転換した。トランスジェニック花はかなりの量のベチューニン及びマルビジンを生産し、これらは非形質転換植物中では検出されなかった(表3B)。ベチューニ

ジン及びマルビジンはいずれもデルフィニジンのメチル化誘導体である。

表3B
高pH系Rp57 x Rwl4の色素分析

酸加水分解された花弁抽出物に見出されるアントシアニジンの%

植 物	シアニジン (%)	ベオニジン (%)	ベチューニン (%)	マルビジン (%)
ベチューニア				
Rp57 x Rwl4	5.0	95.0	0	0
Rp57 x Rwl4 /pCGP90	0	45.2	7.8	47.0

導入されたHf1 cDNAのSkr4 x Sw63雑種における発現は花の色に顕著な効果を有した。非トランスジェニック花の雄ずい葉及び雄ずい組織が白いが、トランスジェニック植物の同じ組織は青/紫色であった。さらに、Skr4 x Sw63雑種におけるHf1 cDNAの発現は、通常は非常に淡いピンクである花冠深いピンク/スミレ色の色合いを与えた。タバコの場合、デルフィニン誘導体の生産は老化つつある花をわずかに青くした。Rp57 x Rwl4雑種におけるHf1 cDNAの発現はやはり花の色に顕著な効果を有した。非トランスジェニックRp57 x Rwl4の花はピンクであり、主たるアントシアニンであるベオニジンが存在した(表3Bを参照のこと)。Hf1 cDNAによる形質転換は花の色を顕著に青くした。

観察される色の変化はまた、Royal Horticultural Society's Color Chartからの番号として記載することができる。一般に、変

化は色を60C/D-65C/Dの淡青〜中間ピンク色調から、70と85の間のカラースクエアーのすべてではないが多くによって代表される時青/紫色調に動かすものとして記載することができる。達成され得る可能な色の変化を限定することは望まないが、Skr4 x Sw63 雑種において観察される色の幾つかは、65B(非形質転換)から70B及び74B(いずれも形質転換されている)への変化を有するものとして記載することができよう。同様に、Rp57 x Rwl4 雑種における幾つかは64Cから72B, 77Bそして82Bに動くものとして記載することができよう。他の生化学的及び生理学的条件が個々の結果に影響を与えるであろうこと、及び達成される特定の色への言及は可能な範囲を定義するものと解釈すべきでないことを記述すべきである。

他の植物種における推定上の3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子配列の検出

3', 4', 5'-ヒドロキシル化フラボノイドの存在は3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性、そしてそれ故に3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子に関連する。他の種からのこれらの遺伝子は低ストリンジエンシー条件下でベチュニアの3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子とハイブリダイズするであろう。RNA(図16)及び/又はDNA(図17)を多数のデルフィニジン生産植物から単離し、³²P-ラベル化Hf1 cDNAによりプローブし、そして異なるストリンジエンシー条件下で洗浄した。すべての例においてハイブリダイズするバンドを検出した。従って、他のビルフィニン生産植物からの3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子の単離は、プローブとしてベチュニアの3', 5'-ヒドロキシラーゼ遺伝子を用いて可能である。

ここに記載した発明は、具体的に記載したもの以外の変更が可能であることを当業者は認識するであろう。本発明はこの様な変更のすべてを包含すると理解すべきである。本発明はまた、本明細書の

個々に又は集合的に言及され又は示される段階、特徴、組成物及び化合物、並びに該段階又は特徴の2以上の任意のそしてすべての組合せを包含する。

参考文献

- Asen, S., Stewart, R. N. 及び Norris, K. H. *Phytochemistry* 14:2677-2682, 1975.
- Asen, S., Griesbach, R. J., Norris, K. H. 及び Leonhardt, B. A. *Phytochemistry* 25:2509-2513, 1986.
- Ashikari, T., Kiuchi-Goto, N., Tanaka, Y., Shibano, Y., Amachi, T., 及び Yoshizumi, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:515-520, 1989.
- Aviv, H. 及び Leder, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412, 1972.
- Beale, G. H. *Journal of Genetics* 40(3):337-358, 1940.
- Bethesda Research Laboratories, BRL pUC host: E. coli DH5a TM competent cells. Bethesda Res. Lab. Focus. 8(2):9, 1986.
- Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R. 及び Christoffersen, R. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3904-3908, 1990.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. 及び Short, J. M. *Biotechniques* 5:376, 1987.
- Comai, L., Moran, P. 及び Maslyar, D., *Plant Molecular Biology* 15:373-381, 1990.
- Cornu, A., *Genetics*. In: *Petunia Sink*, K. C. (Ed), Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 35-47, 1984.
- Cornu, A., Farcy, E., Maizonnier, D., Haring, M., Veerman, W. 及び Gerats, A. G. M. In *Genetic maps-Locus maps of complex genomes*, 5th edition, Stephen J. O'Brien (Ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1990.
- Deilaporta, S. J., Wood, J. 及び Hick, J. B. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19
- E. 及び Mol, J. N. M. *Nucl. Acids Res.* 14(13):5229-5239, 1986.
- Larson, R. L. 及び Bussard, J. B. *Plant Physiol.* 80:483-486, 1986.
- Lazo, G. R., Pascal, A. S. 及び Ludwig, R. A. *Bio/technology* 9:963-967, 1991.
- Lew, A. M. 及び Kemp, D. J. *Nucl. Acids Res.* 17(14):5859-5860, 1989.
- McBride, K. E. 及び Summerfelt, K. R. *Plant Molecular Biology* 14:269-276, 1990.
- Martin, F. M., Castro, N. M., Aboula-ela, F., Tinoco, I. *Nucl. Acids Res.* 13:8927-8938, 1985.
- Matthews, J. M., Dostal, L. A. 及び Bend, J. R. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics* 235(1):186-190, 1985.
- Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1964.
- Murashige, T. 及び Skoog, P. *Physiol. Plant* 15:73-97, 1962.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, P. J., Guengerich, P. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., Waxman, D. J. *DNA and Cell Biology* 10:1-14, 1991.
- Norrander, J., Kemp, T. 及び Messing, J. *Gene* 26:101, 1983.
- Oeda, K., Sakaki, T., 及び Ohkawa, H. *DNA* 4:203-210, 1985.
- O'Keefe, D. P. 及び Leto, K. J. *Plant Physiol.* 89:1141-1149, 1989.
- Ohtsuka, E., Matsuki, S., Ikehara, M., Takahashi, Y. 及び Matsubara, K. J. *Biol. Chem.* 260(5):2605-2608, 1985.
- Pearson, W. R. 及び Lipman, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, 1988.
- Rademacher, W., Pritsch, H., Graebe, J. E., Sauter, H. 及び Jung, J. *Pesticide Science* 21:241-252, 1987.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T. *Molecular Cloning: A*
- 21, 1983.
- De Vlaming, P., Gerats, A. G. M., Wiering, H. 及び Wijsman, H. J. W. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2(2):21-42, 1984.
- Doodeman, M., Gerats, A. G. M., Schram, A. W., de Vlaming, P. 及び Bianchi, F. *Theor. Appl. Genet.* 67:357-366, 1984.
- Ebel, J. 及び Hahlbrock, K., In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*, Harborne, J. B. (Ed.), Academic Press, New York, USA, 641-679, 1988.
- Forkmann, G. *Plant Breeding* 106:1-26, 1991.
- Forkmann, G. 及び Stotz, G. Z. *Naturforsch* 36c:411-416, 1981.
- Garfinkel, D. J. 及び Nester, E. W. *J. Bacteriol.* 144:732-743, 1980.
- Hagmann, M., Heller, W. 及び Grisebach, H. *Eur. J. Biochem.* 134:547-554, 1983.
- Hahlbrock, K. 及び Grisebach, H. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30:105-130, 1979.
- Hanahan, D. J. *Mol. Biol.* 166:557, 1983.
- Harborne, J. B. 及び Simmonds, N. W. *Annu. Rep. John Innes Inst.* 53:29-30, 1962.
- Heller, W. 及び Forkmann, G. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980*, Harborne, J. B. (Ed.), Academic Press, New York, 1988.
- Holton, T. A. 及び Graham, M. W. *Nucleic Acids Research* 19:1156, 1991.
- Inoue, H., Nojiwa, H. 及び Okayama, H. *Gene* 96:23-28, 1990.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. 及び Kimura, A. *J. Bacteriol.* 153:163-168, 1983.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. 及び Bevan, M. W. *EMBO J.* 6(13):3901-3907, 1987.
- Koes, R. E., Spelt, C. E., Reif, H. J., van den Elzen, P. J. M., Veltkamp,

Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

Sanger, P., Nicklen, S. 及び Coulson, A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977.

Schenk, R. U. 及び Hilderbrandt, A. C. Can. J. Bot. 50: 199-204, 1972.

Schram, A. W., Jonsson, L. M. V. 及び Bennink, G. J. H. Biochemistry of flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*. In: *Petunia* Sink, K. C. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 68-75, 1984.

Stafford, H. A. Flavonoid Metabolism. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1990.

Stotz, G. 及び Forkmann, G. Z. Naturforsch 37c: 19-23, 1982.

Stotz, G., de Vlaming, P., Wiering, H. 及び Forkmann, G. Theor. Appl. Genet. 70: 300, 1985.

Takeda, K., Kubota, R. 及び Yagioka, C. Phytochemistry 24: 1207, 1985.

Takemori, S. 及び Kominami, S. Cytochrome P450. Tokyo University Press, Japan, 1989.

Taton, M., Ullman, P., Beneveniste, P. 及び Rahier, A. Pesticide Biochemistry and Physiology 30: 178-189, 1988.

Turpen, T. H. 及び Griffith, O. M. Bio Techniques 4: 11-15, 1986.

van Tunen, A. J., Gerats, A. G. M. 及び Mol, J. N. M. Plant Mol. Biol. Rep. 8: 50-59, 1990.

van Tunen, A. J., Koes, R. E., Spelt, C. E., van der Krol, A. R., Stuitje, A. R. 及び Mol., J. N. M. EMBO J. 7(5): 1257-1263, 1988.

van Tunen, A. J., Mur, L. A., Recourt, K., Gerats, A. G. M. 及び Mol., J. N. M. The Plant Cell 3: 39-48, 1991.

von Wettstein-Knowles, P. Hereditas 60: 317-346, 1968.

Vercruysse, S. A. R., Delcour, J. A. 及び Dondeyne, P. J. Chromatography

324: 495-497, 1985.

Wallroth, M., Gerats, A. G. M., Rogers, S. G., Praley, R. T. 及び Horsch, R. B. Mol. Gen. Genet. 202: 6-15, 1986.

Wiering, H. and De Vlaming, P. Inheritance and Biochemistry of Pigments. In: *Petunia* Sink, K. C. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 49-65, 1984.

Wiering, H. Genen Phaenen 17(1-2): 117-134, 1974.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. 及び Messing, J. Gene 33: 103, 1985.

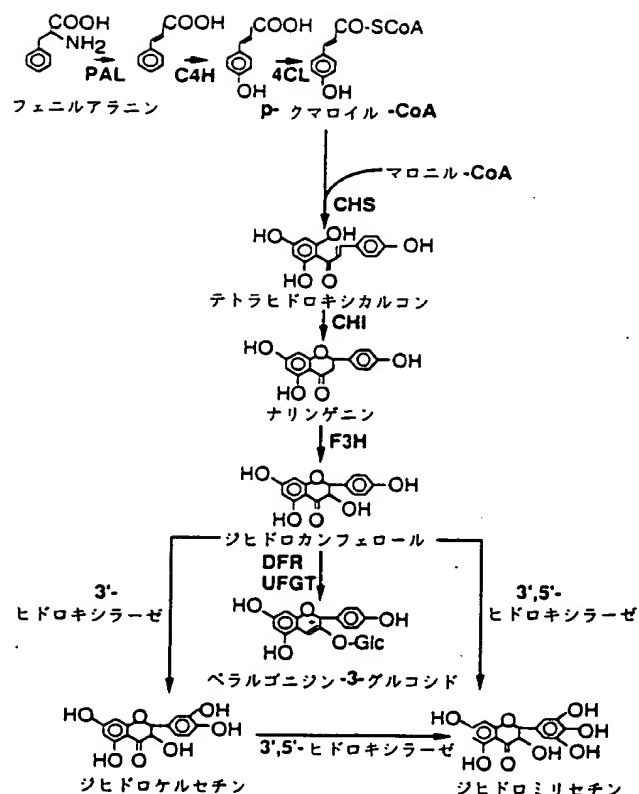
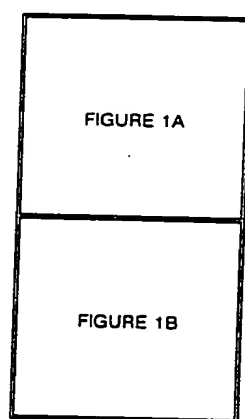


FIGURE 1A

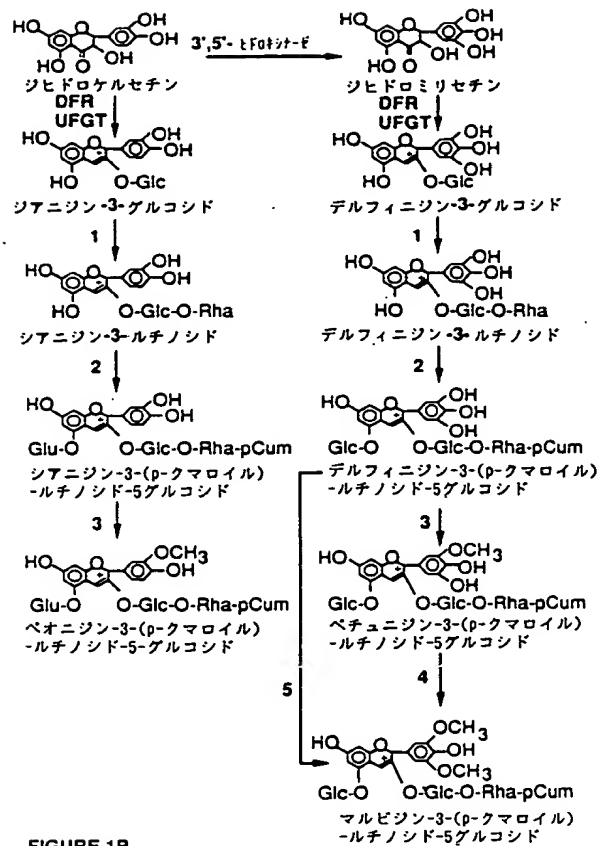


FIGURE 1B

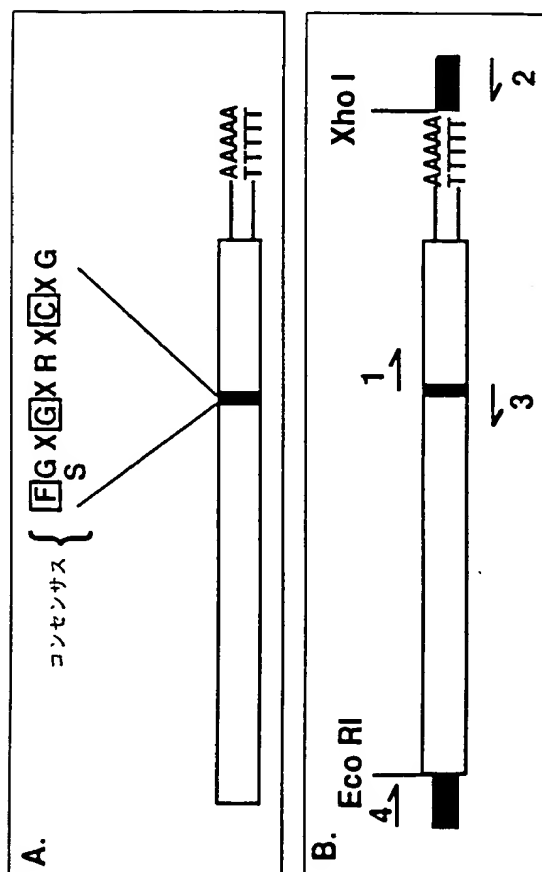
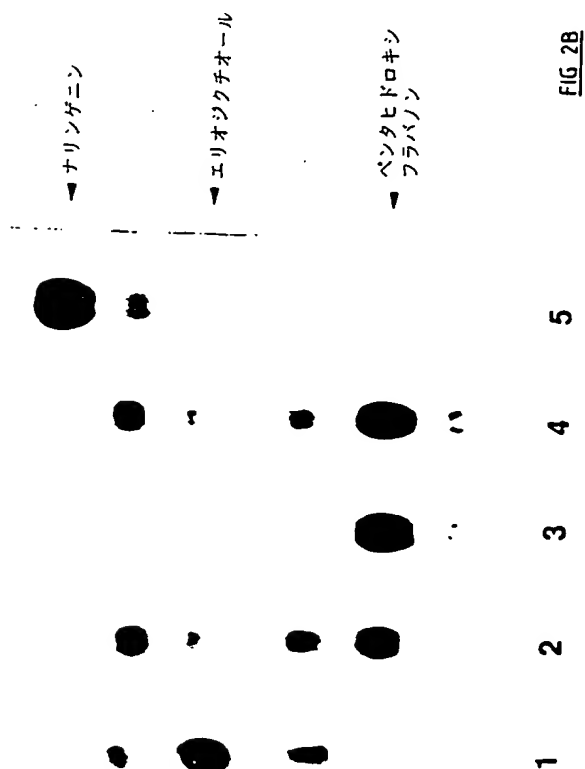
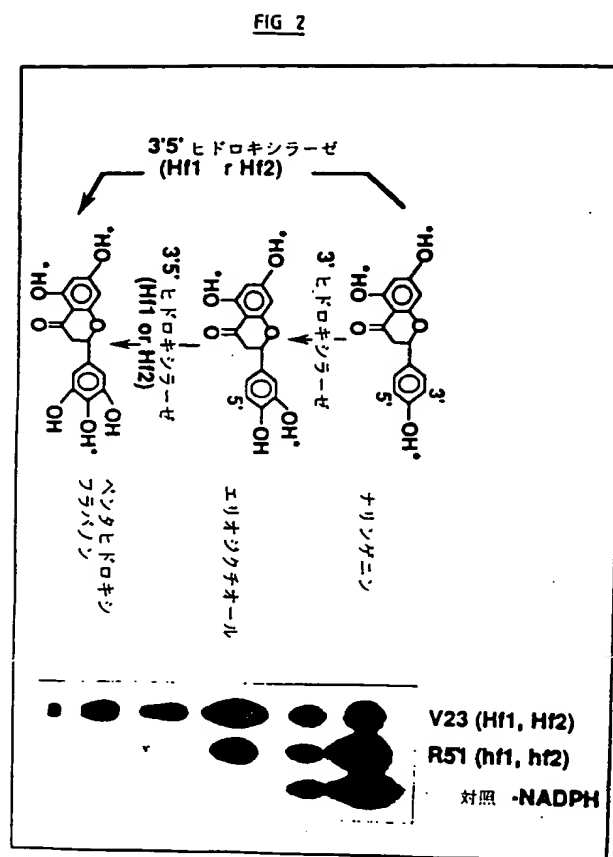


FIGURE 3

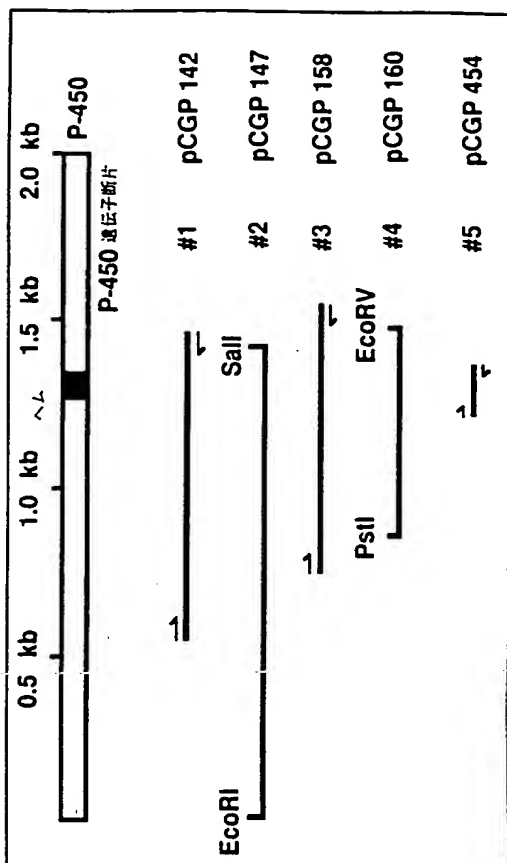


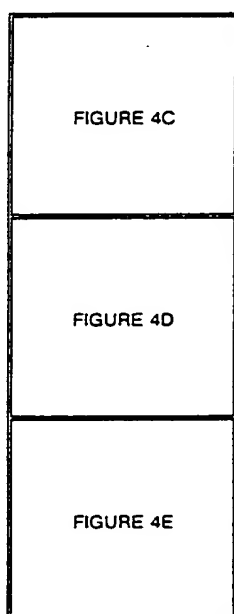
FIGURE 4A

```

F S S I R N D E I S S L
TTT AGT TCA ATT CCG AAT GAT GAG ATT TCG AGT CTC
I S S I H S M N G S V V
ATT TCA TCA ATT CAT TCC ATG AAC GGT TCT GTT GTC
N M T Q K I L C F T N S
AAC ATG ACA CAA AAG ATT CTT TGT TTT ACA AAC TCT
V T C R T A F G K V Y K
GTG ACT TGT AGA ACA GCT TTC GGG AAA GTA TAC AAA
N Q N E L I N L M R E V
AAT CAA AAT GAA TTG ATA AAC TTG ATG AGG GAA GTA
L E L V G G F D -----
CTG GAA TTA GTA GGA GGA TTT GAT -----
F E N S P V E F I G N H
TTT GAA AAT TCT CCG GTT GAG TTT ATT GGA AAT CAC
F E L V P F G A G K R I
TTT GAG CTT GTT CCG TTT GGT ACA GGA AAA AGG ATT
C P G M Q F G L A N I R
TGT CCA GGA ATG CAA TTT GGT TTA GCT AAT ATT AGA
H P L A R F L Y H F N W
CAT CCT TTG GCT CGA TTC CTC TAC CAT TTT AAC TGG
A L P Y E T N P E D L D
GCG CTT CCA TAT GAA ACT AAT CCT GAA GAT TTA GAT
S L K N M D
AGT CTG AAA AAT ATG GAT TAA GTGCAGCAAAAGAGAAAGA
TCTATACTTAATTGCCGTAGATCACAAAGAGGTGATATATAAATTC
TGATGTTCTGCTTTAAATGGTGAAAGTCATACTCTACACAATGCTTC
ATCTCCTTAATTGAGTTTGGTGATCATTGTGTCTCCCTTTTAGCT
TTGAATTTACCTTGAAAAATGATCACATTTCCTTTCTGTTACTC
CAATTAAGATATATGTTGGTGGTCAATTATGCCATATTATCAA
AAGATCAAATCAATTCCTCGTTGATAGTATAGATTATAAACTGA
TTAATGAATCAAAAAAAAAAAAAA

```

FIGURE 4B



```

Q F F N L V S F L L I V F S L
TGCAATTTTCAACTTGGTTTCCTTCTCCTTATTGTATTTCCCTC
10 20 30 40
I S L R K W K K S N C Q T K K L
ATTCATTAGAAAAATGGAAGAAATCCAATTGTCAAACCAAAAAATTG
58 68 78 88
P P G P W K V P F L G S L L H M
CCTCCAGGCCCATGGAAGTACCTTTTCTTGGAAAGCTTGCTTCATATG
106 116 126 136
V G G L P H H V L R D L A K K Y
GTAGGTGGACTTCCACACCATGTCCTTAGAGATTAGCCAAAAATAT
154 164 174 184
G P I M H L Q L G K I S A V V V
GGACCAATTATGCACCTTCAACTAGGTAAATTTCTGCCGTTGTAGTT
202 212 222 232
T S P E M A R K V L K T H D L A
ACTTCTCCTGAGATGGCAAGAAAGTACTAAAACTCATGACCTTGCA
250 260 270 280
F A Y R P K L L G I E I V C Y N
TTTGCATATAGGCCTAACTTCTAGGCATTGAGATTGTCTGCTATAAT
298 308 318 328
S S D I A F S P Y G D Y W R Q M
AGITCAGACATTGCCTTTTCCCGTATGGTGATTACTGGAGGCAAAATG
346 356 366 376
R K I C V L E V L S A K N V R S
CGTAAATTTGTGATTGGAAGTGCTTAGTGCCAAAAATGTCCGGTCA
394 404 414 424
F N S I R R D E I L L M I D F L
TTTAACTCGATTAGACGAGATGAAATACTTCTTATGATCGATTTTGTG
442 452 462 472
R S S S G K P V N I T E R I F S
CGATCATCTTCTGGTAAGCCAGTTAATAACAGAAAGGATCTTTTCA
490 500 510 520

```

FIGURE 4C

-	R	E	S	M	E	D	V	R	L	L	G
CT	CGA	GAA	TCA	ATG	GAA	GAT	GTA	AGA	TTA	CTA	GGC
Y	H	I	P	A	K	T	R	L	F	I	N
TAT	CAC	ATA	CCT	GCT	AAA	ACG	AGA	CTC	TTT	ATC	AAT
A	W	T	M	G	R	D	P	L	T	W	E
GCT	TGG	ACA	ATG	GGG	AGA	GAC	CCA	CTA	ACA	TGG	GAA
N	P	E	E	Y	Q	P	E	R	F	L	N
AAT	CCA	GAA	GAG	TAT	CAG	CCA	GAG	AGA	TTC	TTG	AAT
R	D	T	D	V	K	G	V	N	F	E	F
AGA	GAT	ACT	GAT	GTC	AAA	GGA	GTA	AAC	TTT	GAG	TTC
I	P	F	G	A	G	R	S				
ATT	CCC	TTT	GGC	GCC	GGC	AGA	AGC				

FIGURE 4H

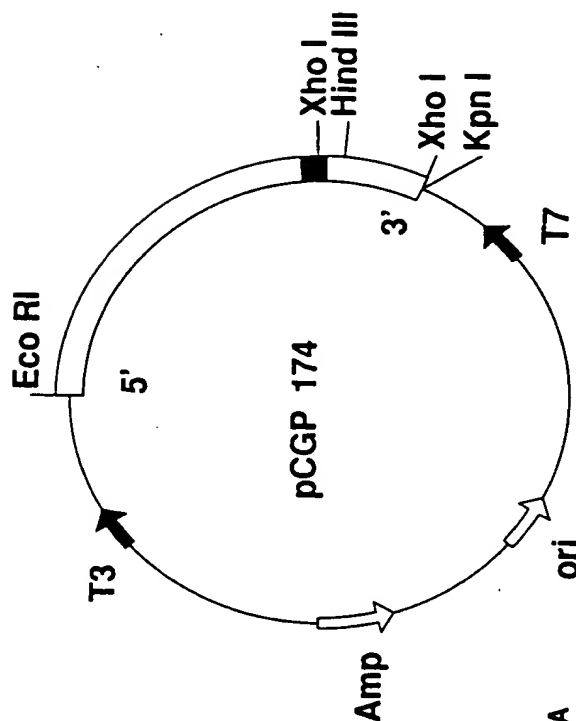


FIGURE 5A

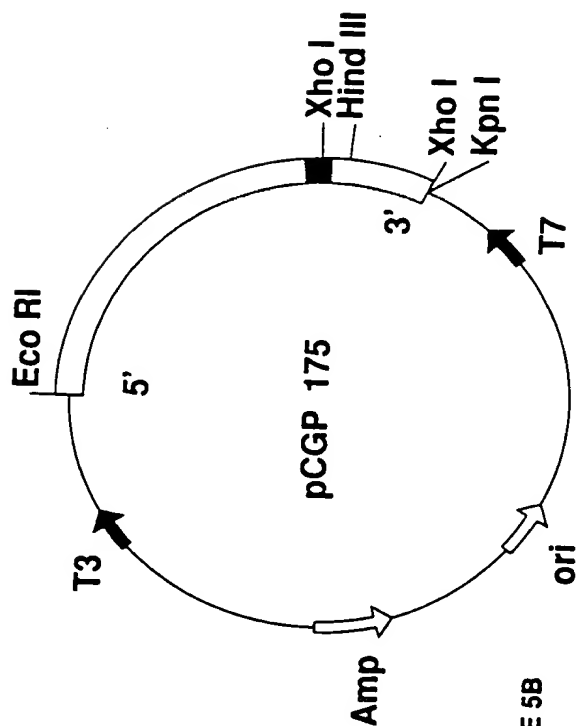
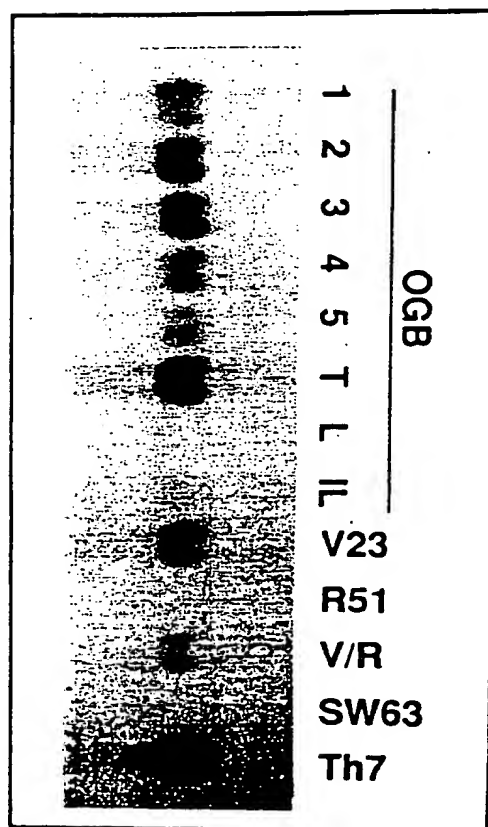
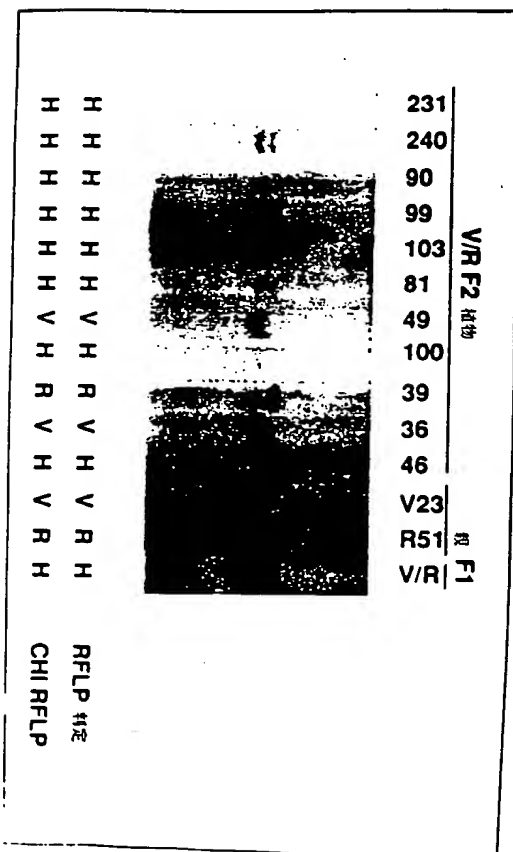
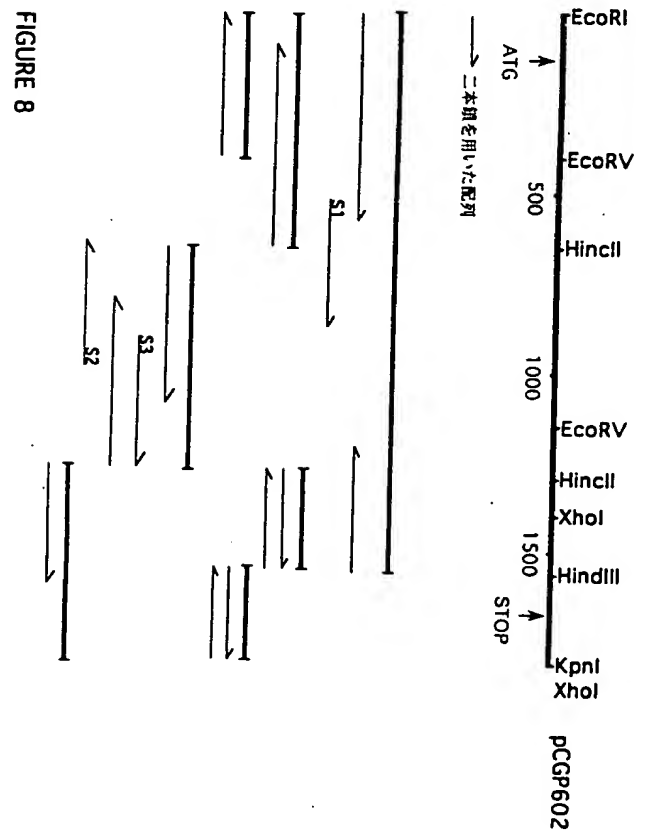
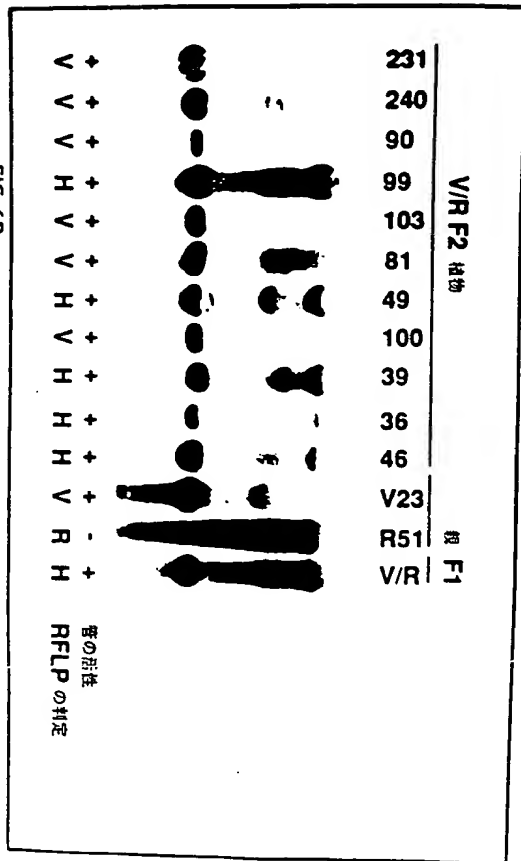
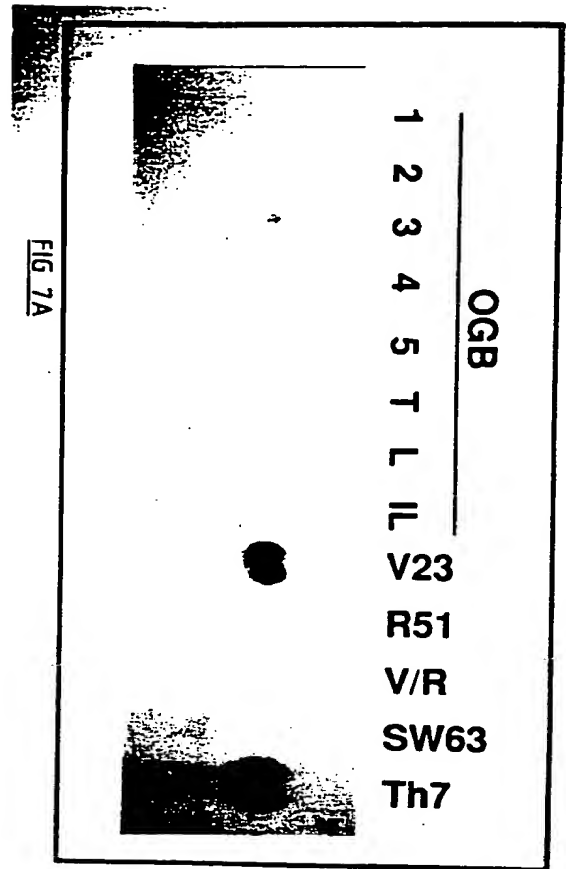
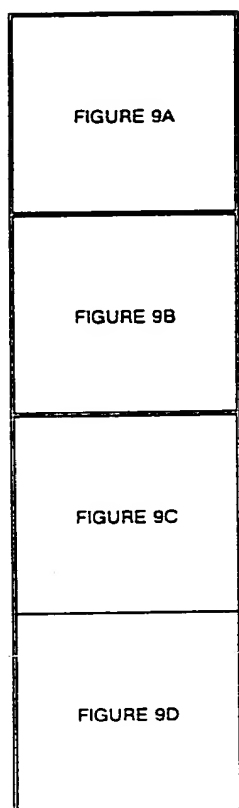


FIGURE 5B







CTTTCTACTAGCTACTTCGTTATATATATGTAATAATTGTGACTTT
 10 20 30 40
 GAAAATCATTAAATTATCATAAGGTTTCATTTTATCTTGATCAAA
 55 65 75 85
 ATATTTACTTCGGCCATATACGTTTTCCTTTAGTCATGATGCTAC
 100 110 120 130
 L T E L G A A T S I F L I A H
 TTACTGAGCTTGGTGCAGCAACTTCAATCTTTCTAATAGCACACA
 145 155 165 175
 I I I S T L I S K T T G R H L
 TAATCATTTCAACTCTTATTTCAAAAACCTACCGCGCGGCTAC
 190 200 210 220
 P P G P R G W P V I G A L P L
 CGCCGGGGCCAAAGAGGGTGGCGGTGATCGGAGCACTTCCACTTT
 235 245 255 265
 L G A M P H V S L A K M A K K
 TAGGAGCCATGCCACATGTTTCTTAGCTAAAATGGCAAAAAAT
 280 290 300 310
 Y G A I M Y L K V G T C G M A
 ATGGAGCAATCATGTATCTCAAAGTTGGAACATGTGGCATGGCAG
 325 335 345 355
 V A S T P D A A K A F L K T L
 TTGCTTCTACCCCTGATGCTGCTAAAGCATTCTTGAAACACTTG
 370 380 390 400
 D I N F S N R P P N A G A T H
 ATATCAACTTCTCCAATCGTCCACCTAATGCAGGTGCCACTTCACT
 415 425 435 445
 L A Y N A Q D M V F A H Y G P
 TAGCTTATAATGCTCAAGACATGGTTTTTGCACATTATGGACCAC
 460 470 480 490
 R W K L L R K L S N L H M L G
 GATGGAAGTTGCTAAGGAAATTAAGCAACTTGCATATGCTAGGGG
 505 515 525 535

FIGURE 9A

G K A L E N W A N V R A N E L
 GAAAAGCCTTAGAGAATTGGGCAATGTTCTGCGCAATGAGCTAG
 550 560 570 580
 G H M L K S M S D M S R E G O
 GGCACATGCTAAAATCAATGTCCGATATGAGTCGAGAGGGCCAGA
 595 605 615 625
 R V V V A E M L T F A M A N M
 GGGTTGTGGTGGCGGAGATGTTGACATTTGCCATGGCCAATATGA
 640 650 660 670
 I G Q V M L S K R V F V D K G
 TCGGACAAAGTATGCTAAGCAAAAGAGTATTTGTAGATAAAGGTG
 685 695 705 715
 V E V N E F K D M V V E L M T
 TTGAGGTAATGAATTTAAGGACATGGTTGTAGAGTTAATGACAA
 730 740 750 760
 I A G Y F N I G D F I P C L A
 TAGCAGGGTATTTCAACATTTGGTGATTTTATTCCTTGTTTAGCTT
 775 785 795 805
 W M D L Q G I E K R M K R L H
 GGATGGATTTACAAGGGATAGAAAAACGAATGAAACGTTTACATA
 820 830 840 850
 K K F D A L L T K M F D E H K
 AGAAGTTTGATGCTTTTATGACAAAGATGTTTGATGAACACAAAG
 865 875 885 895
 A T T Y E R K G K P D F L D V
 CAACTACCTATGAACGTAAGGGGAAACAGATTTTCTTGATGTTG
 910 920 930 940
 V M E N G D N S E G E R L S T
 TTATGGAAAATGGGACAAATCTGAAGGAGAAAGACTCAGTACAA
 955 965 975 985
 T N I K A L L L L N L F T A G T
 CCAACATCAAAGCACTTTTGTGAATTTGTTTCACAGCTGGTACGG
 1000 1010 1020 1030

FIGURE 9B

D T S S S A I E W A L A E M M
 ACACCTTCTTCTAGTGCRAATAGAATGGGCACTTGCAGAAATGATGA
 1045 1055 1065 1075
 K N P A I L K K A Q A E M D Q
 AGAACCTTGCACATTTTGAAGAAAGCAGAGCAGAAATGGATCAAG
 1090 1100 1110 1120
 V I G R N R R L L E S D I P N
 TCATTGGAAGAAATAGGCGTTTACTCGAATCCGATATCCCAATC
 1135 1145 1155 1165
 L P Y L R A I C K E T F R K H
 TCCCTTACCTCCGAGCAATTTGCAAGAAACATTTGAAAAACACC
 1180 1190 1200 1210
 P S T P L N L P R I S N E P C
 CTTCTACACCATTAAATCTTCTAGGATCTCGAACGAACCATGCA
 1225 1235 1245 1255
 I V D G Y Y I P K N T R L S V
 TAGTCGATGGTTATTACATACCAAAAAACACTAGGCTTAGTGTA
 1270 1280 1290 1300
 N I W A I G R D P Q V W E N P
 ACATATGGGCAATTGGAAGAGATCCCAAGTTTGGGAAAATCCAC
 1315 1325 1335 1345
 L E F N P E R F L S G R N S K
 TAGAGTTTAATCCCGAAAGATTCTTGAGTGGAAAGAACTCCAAGA
 1360 1370 1380 1390
 I D P R G N D F E L I P F G A
 TTGATCCTCGAGGGAACGATTTTGAATTGATACCATTTGGTGCTG
 1405 1415 1425 1435
 G R R I C A G T R M G I V M V
 GACGAAGAATTTGTGAGGAAACAGAAATGGGAATTTGTAATGGTGG
 1450 1460 1470 1480
 E Y I L G T L V H S F D W K L
 AATATATATTAGGAACCTTTGGTTTCATTGATTGGAAATTAAC
 1495 1505 1515 1525

FIGURE 9C

P S E V I E L N M E E A F G L
 CAAGTGAAGTTATTGAGTTGAATATGGAAGAAGCTTTTGGCTTAG
 1540 1550 1560 1570
 A L Q K A V P L E A M V T P R
 CTTTGCAGAAAGCTGTCCTCTTTGAAGCTATGGTTACTCCAAGGT
 1585 1595 1605 1615
 L Q L D V Y V P *
 TACAATTGGATGTTTATGTACCATAGCTATAGATGTGTATTGTGC
 1630 1640 1650 1660
 TATAATTGCGCATGTTGTTGGTTGTAGCATGAGATATTAAAAGGA
 1675 1685 1695 1705
 GTACATGAAGCGCATTTGCATGAGTTTAACTTTAGCTCCTTAATA
 1720 1730 1740 1750
 TTTTAGGTATTTTCAATTAATAAGTTCTTGTGGTTGGGTAATA
 1765 1775 1785 1795
 AAAAAAAAAA
 1810

FIGURE 10A

FIGURE 10B

FIGURE 10C

FIGURE 9D

M V L L S E
 TTGAATCCAGCTCTATCTGGCTTTAGCAATGGTGCTACTTAGTG
 10 20 30 40
 L A A A T L I F L T T H I F I
 AGCTTGCTGCAGCAACCTTAATCTTTCTAACACACATATCTTCA
 55 65 75 85
 S T L L S I T N G R R L P P G
 TTTCAACTCTTCTTTCTATAACTAACGGCCGGCTCTCCGCCAG
 100 110 120 130
 P R G W P V I G A L P L L G A
 GGCCAAGAGGGTGGCCGGTGATCGGAGCACTTCCACTTTTAGGAG
 145 155 165 175
 M P H V S L A K M A K K Y G A
 CCATGCCACATGTTTCTTAGCTAAAATGGCAAAAAATATGGAG
 190 200 210 220
 I M Y L K V G T C G M V V A S
 CAATCATGTATCTCAAAGTTGGAACGTGTGGCATGGTAGTTGCTT
 235 245 255 265
 T P D A A K A F L K T L D L N
 CTACCCCTGATGCTGCTAAAGCGTTCTTGAACACTTGATCTCA
 280 290 300 310
 F S N R P P N A G A T H L A Y
 ACTTCTCCAATCGTCCACTTAATGCAGGTGCCACCCACTTAGCCT
 325 335 345 355
 G A Q D M V F A H Y G P R W K
 ATGGTGTCTAAGACATGGTTTTTGCACATTATGGACCAAGATGGA
 370 380 390 400
 L L R K L S N L H M L G G K A
 AGTTGCTAAGGAAATTAAGCAACTTACATATGCTAGGGGGGAAAG
 415 425 435 445
 L E N W A N V R A N E L G H M
 CCTTAGAAAATTGGGCAATGTTCTGTCGAATGAGCTAGGACACA
 460 470 480 490
 L K S M F D M S R E G E R V V
 TGCTAAAATCGATGTTTGATATGAGCAGAGAAAGGGGAGAGATTG
 505 515 525 535

FIGURE 10A

V A E M L T F A M A N M I G Q
 TGGTGGCGGAGATGTTGACATTTGCCATGGCGAATATGATCGGAC
 550 560 570 580
 V I L S K R V F V N K G V E V
 AGGTGATACTTAGCAAAAGAGTATTGTAAATAAGGTGTTGAGG
 595 605 615 625
 N E F K D M V V E L M T T A G
 TAAATGAATTTAAGGACATGGTGGTAGAGTTAATGACAACAGCAG
 640 650 660 670
 Y F N I G D F I P C L A W M D
 GGTATTTTAAACATTGGTGATTTTATTCCTTTGTTAGTTGGATGG
 685 695 705 715
 L Q G I E K G M K R L H K K F
 ATTTACAGGGATAGAAAAAGGAATGAAACGTTTACATAAGAAAT
 730 740 750 760
 D A L L T K M F D E H K A T S
 TTGATGCTTTATTGACAAAGATGTTTGATGAACACAAAGCACTA
 775 785 795 805
 Y E R K G K P D F L D C V M E
 GCTATGAACGTAAGGGGAAACAGATTTTCTTGATTGTTGTTATGG
 820 830 840 850
 N R D N S E G E R L S T T N I
 AAAATAGGGACAATCTGAAGGAGAAAGGCTCAGTACAACCAACA
 865 875 885 895
 K A L L L N L F T A G T D T S
 TCAAAGCACTCTTGCTGAATTTGTTTCACAGCTGGTACAGCACTT
 910 920 930 940
 S S A I E W A L A E M M K N P
 CTTCTAGTGCAATAGAAATGGGCCTTGCAGAGATGATGAAGAACC
 955 965 975 985
 A I L K K A Q G E M D Q V I G
 CTGCCATTTTAAAGAAAGCACAAGGAGAAATGGATCAAGTCATTG
 1000 1010 1020 1030
 N N R R L L E S D I P N L P Y
 GAAACAATAGGCGTCTGCTCGAATCGGATATCCCAATCTCCCTT
 1045 1055 1065 1075

FIGURE 10B

L R A I C K E T F R K H P S T
ACCTCCGAGCAATTTGCAAAGAAACATTTGAAAGCACCTTCTA
1090 1100 1110 1120

P L N L P R I S N E P C I V D
CACCATTAAATCTCCCTAGGATCTCGAACGAACCATGCAATTGTCG
1135 1145 1155 1165

G Y Y I P K N T R L S V N I W
ATGGTTATTACATACCAAAAAACACTAGGCTTAGTGTTAACATAT
1180 1190 1200 1210

A I G R D P E V W E N P L E F
GGGCAATTGGAAGAGATCCCGAAGTTTGGGAGAACCCTAGAGT
1225 1235 1245 1255

Y P E R F L S G R N S K I D P
TTTATCTGAAAGGTTCTTGAGTGGAGAACTCGAAGATTGATC
1270 1280 1290 1300

R G N D F E L I P F G A G R R
CTCGAGGGAGACGACTTTGAATTGATACCATTTGGTGCTGGACGAA
1315 1325 1335 1345

I C A G T R M G I V M V E Y I
GAATTTGTGCAGGGACAAGAATGGGAATCGTAATGGTGGAATATA
1360 1370 1380 1390

L G T L V H S F D W K L P S E
TATTAGGAACCTTTGGTCCATTTCATTTGATTGGAAATTACCAAGTG
1405 1415 1425 1435

V I E L N M E E A F G L A L Q
AAGTTATTGAGCTAAATATGGAAGAAGCTTTTGGATTAGCTTTGC
1450 1460 1470 1480

K A V P L E A M V T P R L P I
AGAAAGCTGTCCCTCTTGAAGCTATGGTTACTCCAAGGCTGCCTA
1495 1505 1515 1525

D V Y A P L A *
TTCATGTTTATGCACCTTTAGCTTGAAACATGCCTTTACGTTGGT
1540 1550 1560 1570

TTCAGTTTGGGTAGTATAATGTTGTGGTGTGGCTATAGAAAT
ATTAATAAATGCTAGTATCTTGAAGCGCGTGCAGGGGGAGGGGG
TTGTCTTAGATAGTAGTAATATGTTAGCCTTCCTTTTATTCTTG
TGATTGTGAGAATCTTGATATGTTTCTTGAAAAAAAAAAAAA

FIGURE 10C

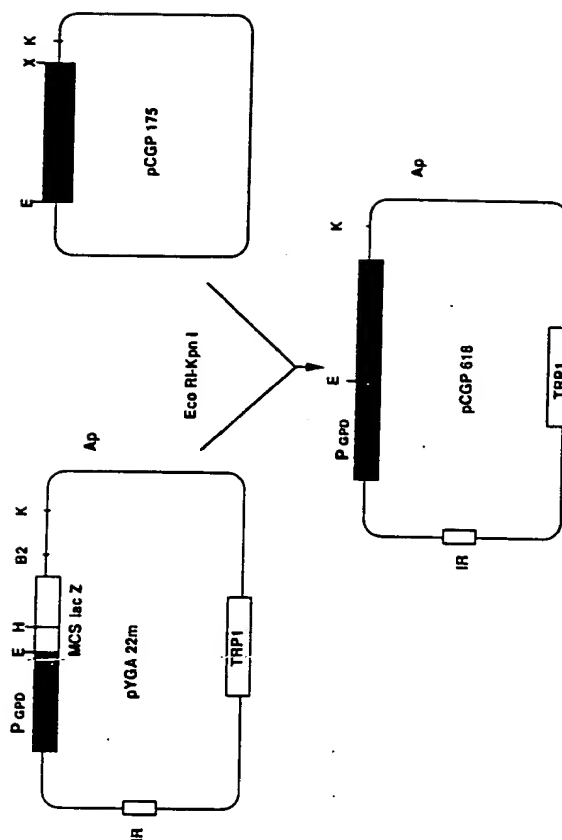


FIGURE 11

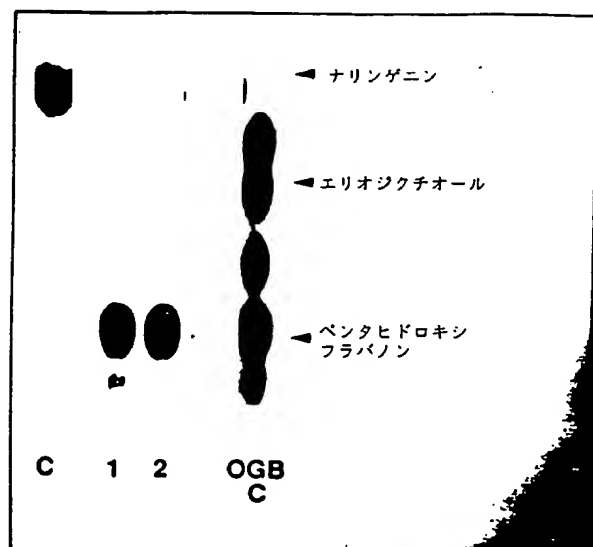


FIG 12A

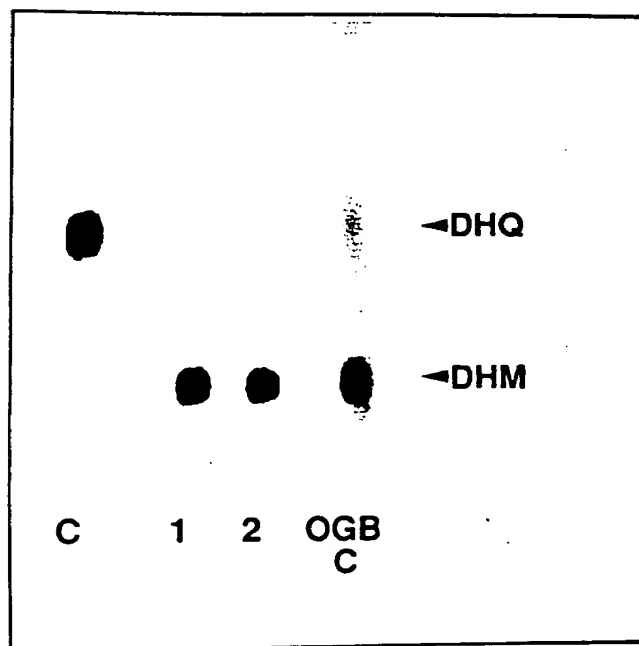


FIG 12B

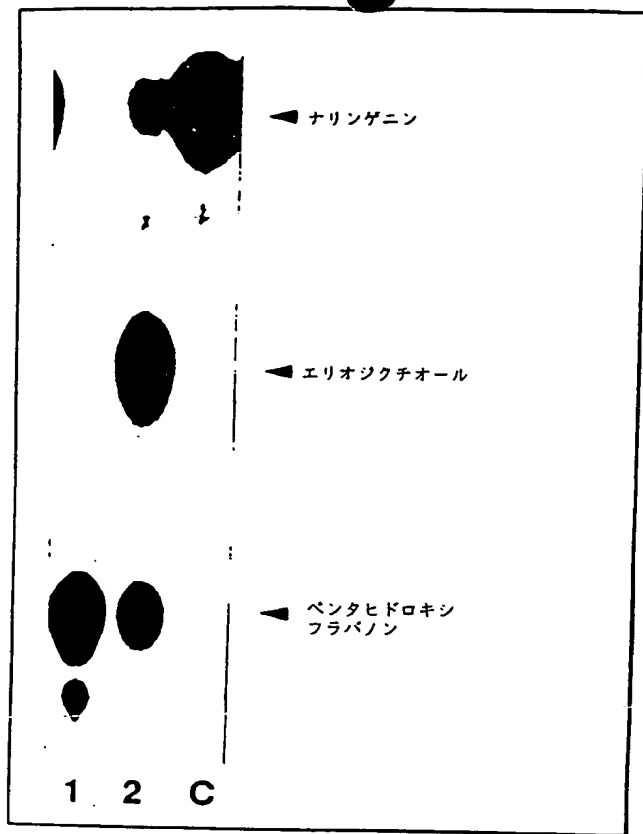


FIG 13

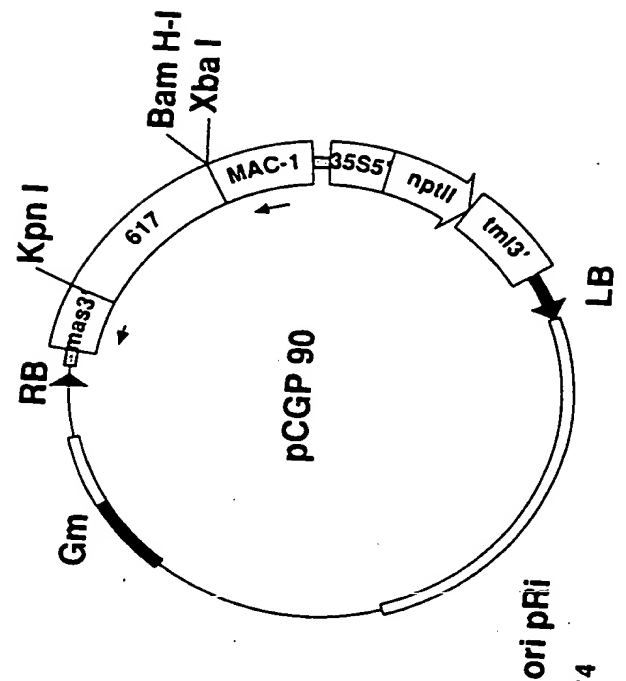


FIGURE 14

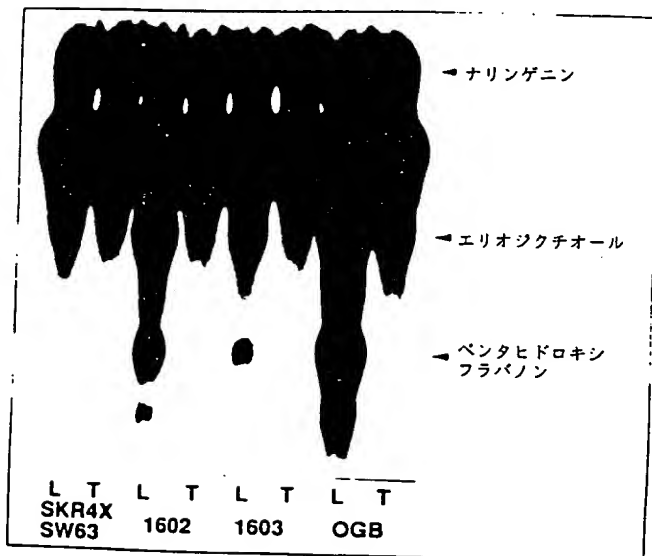


FIG 15

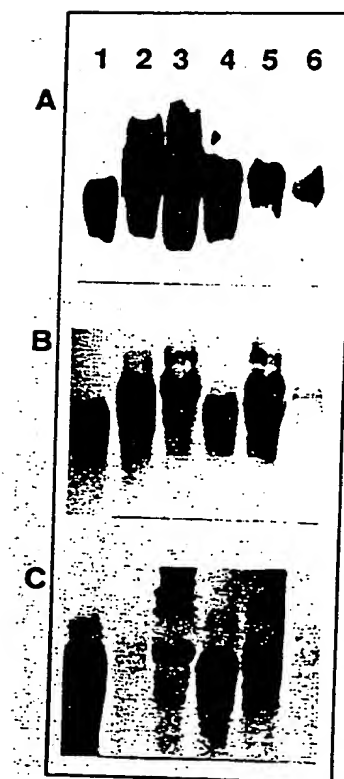


FIGURE 16

国际調査報告

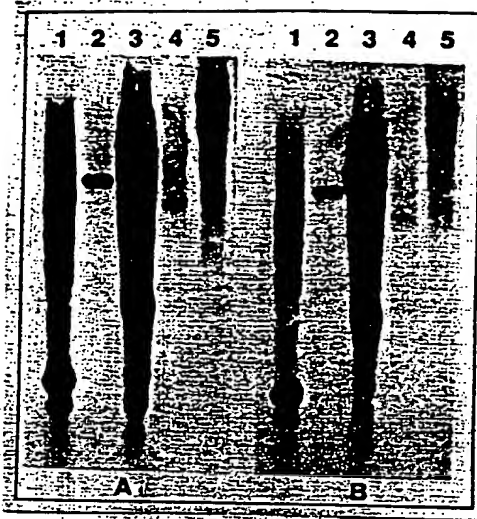
International application No.
PCT/AU92/08334

FIGURE 17

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C12N 15/33 A01H 5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N, A01H		
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched AU: C12N 15/33, A01H 5/00, A01H 5/02		
Electronic data has been searched during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) DERWENT DATABASE: WPAT. SIOT-KEYWORDS: FLAVONOID, MONOOXYGENASE, HYDROXYLASE, DIHYDROCAMPHEROL, DIHYDROKAEAMFEROL, P450, COLOUR, PIGMENT, FLOWER, ROSE, PETUNIA, BLUE CHEMICAL ABSTRACTS: CASH-KEYWORDS: FLAVONOID, FLOWER, ROSE, COLOUR, BLUE, HYDROXYLASE, ENZYME		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	EP.A. 316797 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 24 May 1989 (24.05.89) entire document	
A	AU.A. 54123/90 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORPORATION) 11 October 1990 (18.10.90) entire document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family name.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "T" document published prior to the filing date of the international filing date. "L" document which is a prior art document as to priority claim(s) but which is not a prior art document as to the substance of the invention. "O" document which is a prior art document as to the substance of the invention but which is not a prior art document as to priority claim(s). "P" document published prior to the international filing date but which is not a prior art document as to priority claim(s).		
Date of the actual completion of the international search 18 October 1992 (18.10.92)		
Date of mailing of the international search report 30 October 1992 (30.10.92)		
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WIDEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No. 06 2537929		
Authorized officer W. OSBORNE Telephone No. (06) 2532113		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (7)) (July 1992) English

国际調査報告

International application No.
PCT/AU92/08334

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	Derwent WPAT Online Abstract Accession no. 90-12380/24 JP.A. 2119777 (MITSUBISHI KASEI CORP.) 7 May 1990 (07.05.90)	
A	Zeitschrift für Naturforschung, Section C, Volume 44, No. 4, 1989 KOCHS et al. "Induction and characterization of a NADPH-dependent flavone-synthase from cell cultures of soybean, conversion of (2S)-naringenin to epigallocatechin gallate" pp. 343-48 whole article	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet (7)) (July 1992) English

国际調査報告

International application No.
PCT/AU92/08334

Box 1 Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This international search report has not established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claim No.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> Claim No.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claim No.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box 2 Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not require payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim No.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first disclosed in the claims:
Remark on Prior Art	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992) English

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US

- (72)発明者 コーニッシュ, エドウィナ セシリー
オーストラリア国, ビクトリア 3808, ア
ッパービーコンスフィールド, リードベタ
ー ロード, ロット 33
- (72)発明者 コバシク, フィリパ
オーストラリア国, ビクトリア, 3072, ブ
レストン, カリムナ ストリート 11
- (72)発明者 タナカ ヨシカズ
オーストラリア国, ビクトリア 3084, ロ
サナ, ベルビュー アベニュー 5/49
- (72)発明者 レスター, ディアン ルース
オーストラリア国, タスマニア, 7190, ト
リアブナ, パートン アベニュー 52